

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

DÉVELOPPEMENT ET OPTIMISATION D'UN PROCÉDÉ
FERMENTAIRE ISOPROPANOL-BUTANOL-ÉTHANOL (IBE)

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA
MAÎTRISE EN SCIENCES ET GÉNIE DES MATÉRIAUX
LIGNOCELLULOSIQUES

PAR
ANDREA MARCELA RESTREPO

JUIN 2021

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

Sciences et génie des matériaux lignocellulosique (Ms.C.A.)

Direction de recherche :

Simon Barnabé

Directeur de recherche

Yacine Boumghar

Codirecteur de recherche

Jury d'évaluation

Marzouk Benali

Examineur externe

Tagnon Missihoun

Examineur interne

Yacine Boumghar

Codirecteur de recherche

Remerciements

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma gratitude.

Je remercie le directeur du CÉPROCQ, Dr Yacine Boumghar de m'avoir donné la possibilité de réaliser ma maîtrise et ainsi améliorer mes compétences et pouvoir réaliser mon travail au CÉPROCQ.

Je souhaite également remercier mon directeur de recherche, Dr Simon Barnabé, pour les outils méthodologiques à la conduite de cette recherche.

Merci aux chercheurs du CÉPROCQ, Naïma El Medhi et Mathieu Sarrazin, pour les conseils et les méthodes d'analyses développées pendant ce travail.

Je remercie ma famille et mes amis pour leurs encouragements pendant mes études.

Résumé

Alors que le bioéthanol a de nombreuses propriétés bénéfiques comme produit de substitution à l'essence issu du raffinage du pétrole, il présente de nombreuses lacunes, notamment une tension de vapeur élevée, une affinité pour l'eau et un pouvoir calorifique plus faible que l'essence, présentant ainsi une complexité logistique importante pour son mélange, son transport et son utilisation.

Un compromis intéressant est de produire du biobutanol. Il est de plus en plus considéré comme un fuel automobile supérieur au bioéthanol, car son contenu énergétique est supérieur. Le problème de séparation rencontré entre les mélanges d'essences avec le bioéthanol est moindre dans le cas du biobutanol. De plus, il réduit significativement les émissions polluantes, il est moins corrosif et il peut être mélangé avec l'essence à différents pourcentages. Des recherches suggèrent même qu'il pourrait être mélangé avec de l'essence ou du diesel jusqu'à un pourcentage de 45 %, sans aucune modification du moteur ou de perte de performance. De plus, le biobutanol peut contribuer significativement à verdir la chimie, car c'est une molécule-plateforme qui peut être utilisée dans différents produits chimiques tels que les peintures, etc. La voie la plus connue pour l'obtention du butanol, est la fermentation acétone-butanol-éthanol (ABE), mais elle possède des inconvénients, puisque l'acétone représente un problème au niveau des installations industrielles. Pour cette raison, ce projet de maîtrise visait à démontrer la faisabilité de la fermentation Isopropanol-Butanol-Éthanol (IBE) au lieu de la fermentation ABE.

En utilisant la souche *Clostridium beijerincki* DSM 6423, plusieurs essais ont été réalisés, en commençant par identifier la concentration de glucose offrant le meilleur rendement en butanol. Cette concentration a été de 60 g/L avec un rendement IBE de 0,225 g de butanol/g sucres consommés. Cependant, il a été observé que la consommation de glucose n'était que de 54 % à 58 %, ce qui a conduit à examiner des alternatives pour améliorer l'assimilation de glucose. Plusieurs avenues ont été explorées afin d'optimiser cette conversion : débiter la fermentation avec un pH initial de 5, l'utilisation d'un tampon acétate 50 mM avec un pH 5,5, l'ajout de 60 mM de butyrate de sodium, l'utilisation de

5 g/L de CaCO_3 et finalement une fermentation avec contrôle de pH, autour d'une valeur de 5,5.

Bien que le rendement global du butanol n'ait pas été amélioré, il a été possible d'augmenter la consommation de glucose, car elle a passé de 52 % à 78 %, ce qui indique l'importance de contrôler et de suivre le pH pour générer suffisamment d'acides pour favoriser le passage de la phase acidogène vers la phase de production de solvants et aussi pour maintenir une concentration qui permet la transformation, en continu, des acides vers les produits d'intérêt.

Un milieu contenant un mélange des sucres synthétiques similaires aux concentrations présentes dans le bois de bouleau jaune, un substrat lignocellulosique avec lequel le CÉPROCQ a déjà travaillé dans le passé, a été utilisé. Même si ces conditions n'ont pas favorisé le rendement en butanol, l'expérience a permis d'observer le comportement de la bactérie en présence des différents substrats et sa préférence pour le glucose.

Finalement, la fermentation IBE optimisée a été testée avec l'hydrolysat obtenu à partir de la tige de maïs prétraitée. Bien que les rendements soient similaires, il a été observé que les fermentations ont mis plus de temps à démarrer, possiblement dû à la présence de composés phénoliques, avec une concentration potentiellement inhibitrice, mais qui a retardé la production de solvants.

Ce projet a démontré le potentiel d'un procédé fermentaire IBE et il propose une nouvelle voie de valorisation des résidus lignocellulosiques par fermentation.

Mots Clés

Clostridium beijerinckii, fermentation IBE, biobutanol, isopropanol, hydrolyse enzymatique, tige de maïs.

Table des matières

Remerciements	3
Résumé	4
Table des matières.....	6
Liste des figures	9
Liste des tableaux	12
Liste des Abréviations.....	14
Chapitre 1 - Introduction	15
Chapitre 2 - Revue de la littérature.....	16
2.1 Le butanol.....	16
2.1.1 Production de biobutanol	17
2.1.1.1 Producteurs naturels de butanol.....	17
2.1.1.2 Métabolisme	18
2.1.2 Fermentation IBE.....	20
2.1.2.1 <i>Clostridium beijerinckii</i> DSM 6423	21
2.1.2.2 Isolation de souches IBE	22
2.1.2.3 Fermentations IBE à partir de substrats lignocellulosiques.....	23
Chapitre 3 - Objectifs du projet.....	28
3.1 But du projet.....	28
3.2 Hypothèses	28
3.2.1 Concentration de glucose.....	28
3.2.2 Consommation du glucose et production de butanol.....	29
3.2.3 La tige de maïs en tant que source de sucres fermentables.....	29
3.3 Objectifs	30
Chapitre 4 - Matériels et méthodes.....	31
4.1 Fermentations IBE avec la souche de référence.....	31

4.1.1	Souche de référence <i>Clostridium beijerinckii</i> DSM 6423	31
4.1.2	Milieu de préculture et de fermentation.....	31
4.1.3	Préculture	31
4.1.4	Fermentations.....	32
4.1.4.1	Fermentations sans contrôle de pH.....	32
4.1.4.2	Fermentations avec contrôle de pH	33
4.1.5	Suivi de la croissance bactérienne	33
4.1.6	Mesure de pH.....	33
4.1.7	Méthodes analytiques.....	34
4.1.7.1	Chromatographie en phase liquide à haute performance.....	34
4.1.7.2	Chromatographie en phase gazeuse.....	34
4.1.8	Série de fermentations.....	35
4.2	Substrat agricole.....	37
4.2.1	Hydrolyse enzymatique	37
4.2.2	Fermentations.....	37
4.2.2.1	Préculture.....	37
4.2.2.2	Fermentations avec l'hydrolysat.....	38
Chapitre 5 - Résultats		39
5.1	Étude de la fermentation IBE	39
5.1.1	Différentes concentrations de glucose	39
5.1.2	Fermentations avec pH initial 5 et tampon acétate pH 5	44
5.1.3	Fermentations avec butyrate de sodium (60 mM)	49
5.1.4	Fermentations avec 5 g/L de carbonate de calcium (CaCO ₃).....	55
5.1.5	Fermentations avec contrôle du pH à 5,5.....	61
5.1.6	Fermentations avec un mélange de sucres	68
5.1.7	Fermentations avec l'hydrolysat à partir de la tige de maïs.....	72
Chapitre 6 - Discussion		75
6.1	Concentration initiale de glucose	75
6.2	Contrôle de pH	76
6.3	Ajout de butyrate.....	80
6.4	Fermentations avec un mélange de sucres	80

6.5 Fermentations avec hydrolysats de la tige de maïs.....	82
Chapitre 7 - Conclusion	84
Bibliographie	86
Annexe.....	91
A.1. Milieu de culture TYA	91
A.2. Calcul des acides non dissociés.....	92

Liste des figures

Figure 2.1 Applications du butanol.....	16
Figure 2.2 Métabolisme de fermentation des organismes du genre <i>Clostridium</i> producteurs de butanol.	20
Figure 2.3 Schéma de l'activité enzymatique des cellulases.....	25
Figure 5.1 Consommation de glucose pour différentes concentrations initiales	40
Figure 5.2 Production de butanol pour différentes concentrations initiales de glucose.....	40
Figure 5.3 Production d'isopropanol pour différentes concentrations initiales de glucose.....	41
Figure 5.4 Rendement IB pour différentes concentrations initiales de glucose.....	41
Figure 5.5 Variation du pH avec différentes concentrations initiales de glucose.....	42
Figure 5.6 Consommation de glucose du contrôle et les fermentations avec un pH initial 5 et tampon acétate.....	44
Figure 5.7 Production de butanol pour le contrôle et les fermentations avec un pH initial 5 et tampon acétate.....	45
Figure 5.8 Production d'isopropanol pour le contrôle et les fermentations avec un pH initial 5 et tampon acétate.....	45
Figure 5.9 Rendement IB pour le contrôle et les fermentations avec un pH initial 5 et tampon acétate.....	46
Figure 5.10 Variation du pH pour le contrôle et les fermentations avec un pH initial 5 et tampon acétate.....	46
Figure 5.11 Consommation de glucose pour les fermentations avec butyrate de sodium (60 mM).....	50
Figure 5.12 Production de butanol pour les fermentations avec butyrate de sodium (60 mM).....	50
Figure 5.13 Production d'isopropanol pour les fermentations avec butyrate de sodium (60 mM).....	51
Figure 5.14 Rendement IB pour les fermentations avec butyrate de sodium (60 mM).....	51

Figure 5.15 Variation du pH des fermentations avec butyrate de sodium (60 mM).....	53
Figure 5.16 Concentration d'acide acétique pour les fermentations avec butyrate de sodium (60 mM).....	53
Figure 5.17. Concentration d'acide butyrique pour les fermentations avec butyrate de sodium (60 mM).....	54
Figure 5.18 Consommation de glucose pour les fermentations avec CaCO_3 (5 g/L).....	56
Figure 5.19 Production de butanol pour les fermentations avec CaCO_3 (5 g/L)	57
Figure 5.20 Production d'isopropanol pour les fermentations avec CaCO_3 (5 g/L).....	57
Figure 5.21 . Rendement IB pour les fermentations avec CaCO_3 (5 g/L)	58
Figure 5.22 Variation du pH pour les fermentations avec CaCO_3 (5 g/L).....	58
Figure 5.23 Concentration d'acide acétique pour les fermentations avec CaCO_3 (5 g/L).....	59
Figure 5.24 Concentration d'acide butyrique pour les fermentations avec CaCO_3 (5 g/L)	59
Figure 5.26 Production de butanol pour les fermentations avec pH contrôlé.....	62
Figure 5.25 Consommation de glucose pour les fermentations avec pH contrôlé.....	62
Figure 5.27 Production d'isopropanol pour les fermentations avec pH contrôlé	63
Figure 5.28 Rendement IB pour les fermentations avec pH contrôlé	63
Figure 5.29 Variation du pH pour les fermentations avec pH contrôlé	64
Figure 5.30 Concentration d'acide acétique pour les fermentations avec pH contrôlé.....	65
Figure 5.31 Concentration d'acide butyrique pour les fermentations avec pH contrôlé.....	65
Figure 5.32 Concentration d'acide acétique non dissocié pour les fermentations avec pH contrôlé.....	66
Figure 5.33 Concentration d'acide butyrique non dissocié pour les fermentations avec pH contrôlé.....	67
Figure 5.34 Consommation de sucres pour les fermentations F19, F20 et F21	70

Figure 5.35 Production de butanol pour les fermentations avec un mélange de sucres	70
Figure 5.36 Production d'isopropanol pour les fermentations avec un mélange de sucres	71
Figure 5.37 Rendement IB pour les fermentations avec un mélange de sucres.....	71
Figure 5.38. Fermentations avec l'hydrolysate de la tige de maïs prétraitée	73

Liste des tableaux

Tableau 2.1 Enzymes dans le métabolisme de microorganismes <i>Clostridium</i> producteurs de butanol	19
Tableau 2.2 Résultats des fermentations IBE avec <i>Clostridium beijerinckii</i> DSM 6423	21
Tableau 2.3 Résultats fermentations IBE avec souches isolées.....	23
Tableau 2.4 Différents prétraitements pour la biomasse lignocellulosique	24
Tableau 2.5 Résultats des fermentations IBE à partir de substrats lignocellulosiques.....	27
Tableau 4.1 Conditions de la chromatographie en phase liquide à haute performance.....	34
Tableau 4.2 Conditions de la chromatographie en phase gazeuse	35
Tableau 4.3 Séries de fermentations avec la souche <i>C. beijerinckii</i> DSM 6423	36
Tableau 5.1 Résultats de fermentations avec différentes concentrations de glucose à 72 h.....	43
Tableau 5.2 Résultats de fermentations avec différentes concentrations de glucose à 144 h.....	43
Tableau 5.3 Résultats des fermentations avec pH initial de 5 et tampon acétate pH 5 à 72 h	49
Tableau 5.4. Résultats des fermentations avec butyrate (60 mM) à 48 h	55
Tableau 5.5 Résultats des fermentations avec CaCO ₃ (5 g/L) à 48 h	61
Tableau 5.6 Concentration des acides organiques non dissociés au moment du changement vers la phase solvantogène (13,5 h)	67
Tableau 5.7 Résultats finaux des fermentations avec contrôle de pH.....	68
Tableau 5.8 Résultats des fermentations avec un mélange de sucres	72
Tableau 5.9 Concentration de sucres dans l'hydrolysate	72
Tableau 5.10 Résultats des fermentations avec l'hydrolysate de la tige de maïs prétraitee.....	74
Tableau 6.1 Comparaison de résultats des fermentations IBE avec <i>Clostridium</i> <i>beijerinckii</i> DSM 6423	76

Tableau 6.2 Estimation de la concentration d'acide acétique no dissocié au début de la fermentation	77
Tableau 6.3 Effet sur la productivité après l'ajout de CaCO_3 pour les fermentations ABE	79
Tableau 6.4 Concentration inhibitrice des composés phénoliques solubles pour la souche <i>C. beijerinckii</i>	82

Liste des Abréviations

ABE	Acétone-butanol-éthanol
BuOH	Butanol
<i>C. acetobutylicum</i>	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>C. aurantibutyricum</i>	<i>Clostridium aurantibutyricum</i>
<i>C. beijerinckii</i>	<i>Clostridium beijerinckii</i>
<i>C. tétanomorphum</i>	<i>Clostridium tétanomorphum</i>
CaCO ₃	Carbonate de calcium
cm ³ /min	Centimètre cube par minute
CO ₂	Dioxyde de carbone
DO	Densité optique
ÉtOH	Éthanol
FD	Facteur de dilution
g/L	Grammes par litre
GC	Chromatographie en phase gazeuse
h	Heure
H ₂ PO ₄	Acide phosphorique
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
HMF	Hydroxyméthylfurfural
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
IBE	Isopropanol-butanol-éthanol
IPA	Isopropanol
ml/min	Millilitres par minute
mM	Milli molaire
mm	Millimètres
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaOH	Hydroxyde de sodium
ND	Non déterminé
nm	Nanomètres
NO _x	Oxydes d'azote
p/p	Poids/poids
RCM	Reinforced clostridium medium
tr/min	Tours par minute
TYA	Tryptone-yeast extract-acetate
v/v	Volume/volume
XMG	Xylose, mannose et galactose

Chapitre 1 - Introduction

L'objectif de trouver des alternatives pour remplacer les combustibles et les produits d'origine fossile et la conversion vers une économie circulaire, a entraîné l'intérêt de la recherche vers des procédés plus propres ou verts. L'un de ces combustibles est le butanol, dont il a été démontré qu'il possède des caractéristiques similaires à l'essence et qu'il est supérieur comme additif du carburant à l'éthanol, mais l'inconvénient actuellement est sa rentabilité économique pour sa production.

La fermentation ABE génère, en plus du butanol et de l'éthanol, de l'acétone indésirable, ce qui pousse à identifier des alternatives. Une option consiste à développer la fermentation IBE, que permet d'obtenir l'isopropanol, un alcool qui offre plus d'avantages que l'acétone, en raison du risque de corrosion qui peut produire ce dernier dans les pièces de moteur en caoutchouc et ses mauvaises propriétés comme carburant (dos Santos Vieira et al., 2019).

L'expérience acquise lors du développement du projet de fermentation ABE au sein du CÉPROCQ et dont les résultats sont décrits dans l'article « *Acetone–Butanol–Ethanol Production from Eastern Canadian Yellow Birch and Screening of Isopropanol–Butanol–Ethanol-Producing Strains* » a donné des outils pour mieux comprendre la fermentation IBE et faciliter sa compréhension, puisqu'il s'agit d'un sujet à peine exploré et avec peu d'informations disponibles (Benali et al., 2019).

Bien que différentes étapes soient nécessaires pour obtenir les sucres nécessaires à la fermentation, l'utilisation de substrats lignocellulosiques a été envisagée étant donné sa grande disponibilité et la possibilité d'être valorisés pour faciliter un procédé économiquement viable.

Afin d'explorer la production de biobutanol, ce projet cherche à vérifier et valider la faisabilité de la fermentation isopropanol-butanol-éthanol (IBE), en utilisant la souche *Clostridium beijerinckii* DSM 6423 et un milieu de culture alternatif. Un milieu de culture semi-synthétique est d'abord utilisé et ensuite un hydrolysate de tige de maïs, comme un milieu complexe et alternatif.

Chapitre 2 - Revue de la littérature

2.1 Le butanol

Le butanol, n-butanol ou 1-butanol (Ndaba et al., 2015) est un alcool simple, à chaîne droite avec quatre atomes de carbone, incolore, complètement miscible avec les solvants organiques et partiellement miscible avec l'eau. L'intérêt naissant pour sa production est dû à la grande variété des applications industrielles, comme additif dans l'essence, étant donné qu'il peut être facilement mélangé avec elle. Il pourrait également être une option future pour le mélange avec le diesel, car il contient plus d'oxygène, ce qui pourrait avoir pour effet une réduction des émissions, principalement de la suie. Le butanol présente une chaleur d'évaporation plus élevée que l'éthanol, ce qui est bénéfique pour réduire la température de combustion et éventuellement conduire à la réduction de la formation de NOx (da Silva Trindade et al., 2017).

À titre de molécule de plateforme, le butanol est utilisé pour la production de polymères, de carburants oxygénés, d'hydrocarbures, d'élastomères synthétiques, tel que le montre la figure 2.1 (Mascal, 2012).

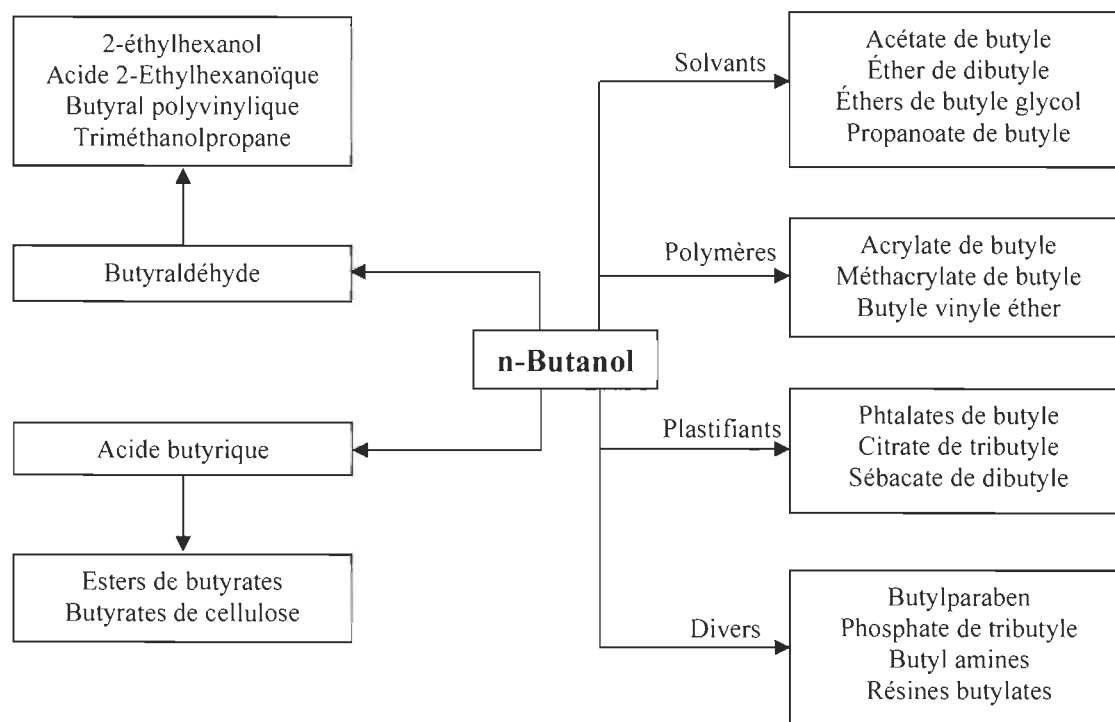


Figure 2.1 Applications du butanol

Le marché mondial du n-butanol était estimé à environ 3,9 milliards de dollars en 2016 et il devrait atteindre environ 5,6 milliards de dollars d'ici 2022, avec un taux de croissance annuel composé de 5,9 % de 2017 à 2022 (Benali et al., 2019). Cette croissance peut être attribuée à une demande accrue pour l'acrylate de butyle dans diverses applications industrielles.

2.1.1 Production de biobutanol

Il existe essentiellement deux voies de production du butanol: par fermentation ou « biobutanol » ou à partir du pétrole ou « petro-butanol ». Les différences entre les deux au niveau des propriétés chimiques sont inexistantes (dos Santos Vieira et al., 2019). La production de butanol par fermentation n'est pas récente et la première tentative a été faite par Louis Pasteur en 1861, mais sa production à grande échelle a commencé au début des années 1920. Cependant, la production industrielle se fait par le procédé d'oxo-synthèse, impliquant l'hydroformylation de propène pour donner du butyraldéhyde et l'hydrogénation subséquente. Le procédé consomme du propène, un dérivé du pétrole à demande relativement élevée (Mascal, 2012). La raison pour laquelle ce processus est toujours utilisé, peut être attribué aux faibles coûts de la production et aux impacts environnementaux qui ne sont pas pris en considération (Benali et al., 2019).

2.1.1.1 Producteurs naturels de butanol

Les micro-organismes capables de produire du biobutanol appartiennent au genre *Clostridium*. Pour être classés en tant que tels, ces micro-organismes doivent répondre à quatre caractéristiques bien définies: être gram positif, être strictement anaérobie, avoir la capacité de former des spores et être incapables d'utiliser le sulfate comme accepteur d'électrons (Andreesen et al., 1989).

Parmi les *Clostridium*, les espèces productrices de butanol avec des quantités variables d'acétone, d'isopropanol et d'éthanol sont les mésophiles saccharolytiques. Il existe, au moins, quatre groupes distincts dus à leur homologie d'ADN et d'autres caractéristiques : *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. aurantibutyricum* et *C. téanomorphum* (Jones et al.,

1989). *C. acetobutylicum* et *C. beijerinckii* sont les plus étudiés actuellement (Xin et al., 2018).

Les souches de *C. acetobutylicum* qui produisent du butanol, de l'acétone et de l'éthanol dans un rapport de 6: 3: 1 ont été largement utilisées pour la production industrielle de solvants. Les souches désormais classées comme *C. beijerinckii*, ne présentent pas d'homologie de l'ADN avec le groupe *C. acetobutylicum* et contiennent, à la fois, des souches qui produisent de l'acétone ou de l'isopropanol en plus du butanol (Jones et al., 1989). La capacité de produire de l'isopropanol au lieu de l'acétone est due à la présence d'une enzyme alcool déshydrogénase primaire/secondaire supplémentaire, qui permet de transformer l'acétone en isopropanol (Yang et al., 2016).

2.1.1.2 Métabolisme

La route de la dégradation du sucre par *C. acetobutylicum* et *C. beijerinckii*, n'a pas été complètement déterminée, mais il est probable qu'elle utilise des réactions glycolytiques de type Meyerhof-Parnas (Dürre, 1998).

Pendant les fermentations ABE ou IBE, deux phases sont observées: une phase acidogène et une phase solventogène. La phase acidogène a lieu au moment de la phase exponentielle de croissance avec une production des acides, principalement de l'acide acétique et de l'acide butyrique, provoquant une chute du pH en dessous de 5 (Yang et al., 2016).

Quant à elle, la phase solventogène est probablement déclenchée par une concentration minimale des acides non dissociés (Maddox et al., 2000) et aucune croissance bactérienne n'est observée. Les acides organiques agissent comme des co-substrats et sont convertis en éthanol, acétone, isopropanol et butanol. Cette réaction peut être considérée comme un mécanisme pour éviter l'accumulation d'acides à des concentrations toxiques (Mitchell, 1997). Finalement, lorsque les concentrations des solvants atteignent certains niveaux, par exemple 20 g/L pour la fermentation ABE (Jones et al., 1986) ou 10,7 g/L pour la fermentation IBE (de Vrije et al., 2013), le métabolisme bactérien s'arrête, donc la production de solvants prend fin également.

Au niveau du rôle des acides non dissociés dans le mécanisme pour déclencher la production de butanol, c'est l'acide butyrique ou sa forme protoné n-butyrate qui semble avoir le plus d'impact. Il peut se propager librement à travers la membrane cellulaire et pénétrer dans le cytoplasme, où le pH est généralement d'une à deux unités, supérieur au pH de l'environnement extracellulaire, en libérant des protons par dissociation. Le n-butyrate est piégé à l'intérieur de la cellule et le pH intracellulaire diminue, ce qui peut avoir un impact négatif sur les activités enzymatiques. Également, le potentiel membranaire, qui est couplé aux processus cellulaires vitaux, est dissipé par le mouvement scalaire des protons dans le cytoplasme. En bref, c'est l'acide butyrique qui est toxique pour les cellules, puisque sa concentration dans le milieu incite la formation de butanol, plutôt que la concentration de n-butyrate total ou la concentration de l'acide acétique (Richter et al., 2012).

Le Tableau 2.1 regroupe les enzymes impliquées dans les transformations des sucres en solvants, tandis que la figure 2.2 montre le métabolisme de la fermentation.

Tableau 2.1 Enzymes dans le métabolisme de microorganismes *Clostridium* producteurs de butanol

Nombre	Enzyme
1	Systèmes phosphoénolpyruvate phosphotransférase et enzymes glycolytiques de la voie Embden-Meyerhof-Parnas;
2	Pyruvate: ferrédoxine oxydoréductase;
3	Tthiolase
4	3-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase
5	Crotonase
6	Butyryl-CoA déshydrogénase
7	Phosphotransbutyrylase
8	Butyrate kinase
9	Phosphotransacétylase
10	Acétate kinase
11	Hydrogénase
12	Lactate déshydrogénase
13	Butyraldéhyde déshydrogénase et aldéhyde / alcool déshydrogénase E
14	Butanol déshydrogénase et aldéhyde / alcool déshydrogénase E
15	Acétoacétyl-CoA: acétase / butyrate coenzyme-A transférase
16	Acétoacétate décarboxylase;
17	Alcool déshydrogénase primaire / secondaire
18	Acétaldéhyde déshydrogénase
19	Éthanol déshydrogénase

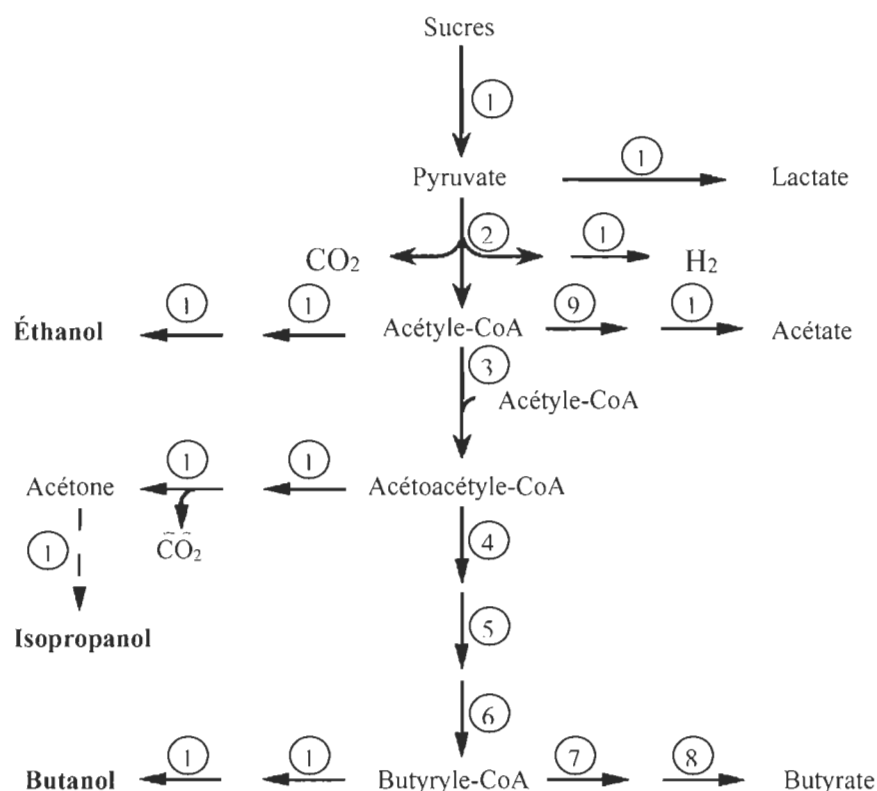


Figure 2.2 Métabolisme de fermentation des organismes du genre *Clostridium* producteurs de butanol.

Les nombres encadrés indiquent les enzymes utilisées et la ligne pointillée vers l'isopropanol indique que seules certaines souches de *C. beijerinckii* sont capables de le produire.

2.1.2 Fermentation IBE

En plus du coût élevé de production qui la rend peu viable économiquement, la fermentation conventionnelle ABE présente aussi l'inconvénient de produire de l'acétone, sous-produit corrosif et peu valorisable (Li et al., 2019). C'est dans ce contexte que la fermentation Isopropanol-Butanol-Éthanol (IBE) suscite un intérêt grandissant des chercheurs et de la communauté scientifique.

Malgré l'intérêt suscité par ce type de fermentation, les micro-organismes sauvages de la fermentation IBE peuvent être inhibés plus facilement par l'accumulation de solvants, principalement par le butanol, que les producteurs des fermentations ABE, les rendant moins efficaces (dos Santos Vieira et al., 2019).

Au cours de la fermentation IBE, il a été observé que les sucres ne sont pas complètement consommés, qu'il s'agisse d'un milieu de culture semi-synthétique ou d'hydrolysats (dos Santos Vieira et al., 2019). Il a également été constaté qu'en présence de glucose et de xylose, il y a une préférence pour la consommation de glucose, un comportement typique de microorganismes du genre *Clostridium* (Mitchell, 1997).

2.1.2.1 *Clostridium beijerinckii* DSM 6423

C. beijerinckii DSM 6423, également NRRL B-593 et anciennement connu sous le nom de *C. butylicum* NRRL B-593 est la souche la plus étudiée jusqu'à maintenant pour la fermentation IBE (Diallo et al., 2018).

Cependant, son rendement reste faible, car dans la fermentation discontinue et en utilisant le glucose ou un mélange glucose/xylose, la concentration en butanol dépasse rarement le 6 g/L (dos Santos Vieira et al., 2019) et les sucres ne sont pas complètement consommés. Le tableau 2.2 résume l'information trouvée dans la littérature en utilisant glucose, xylose ou un mélange des deux, comme source de carbone.

Tableau 2.2 Résultats des fermentations IBE avec *Clostridium beijerinckii* DSM 6423

Sucres	Conc. initiale sucres (g/L)	Consom sucres (%)	Temp ferm.	Acétone (g/L)	IPA (g/L)	EtOH (g/L)	BuOH (g/L)	Rend. BuOH	Réf.
Glucose/xylose	40/20	23,6/10,3	67 h	ND	3,2	0,45	6,9	0,204	(de Vrije et al., 2013)
Glucose	20	ND	144	ND	0,48	ND	4,6	ND	(George et al., 1983)
Glucose	61 ± 4	52 ± 4	47 h	0,2 ± 0,0	2,9 ± 0,4	0,2 ± 0,0	4,0 ± 1,0	0,12 ± 0,03	(Rochón et al., 2015)
Glucose	56 ± 1	53,0 ± 0,1	47 h	0,2 ± 0,0	3,8 ± 0,1	0,2 ± 0,0	4,3 ± 0,2	0,14 ± 0,01	
Glucose	60	33,8	48 h	< 0,1	2,16	< 0,1	3,71	0,187	(Survase et al., 2011)

Rend. BuOH (g BuOH/g glucose consommé)

ND : No détecté

En raison du faible rendement des fermentations IBE, des efforts ont été récemment déployés pour chercher à l'optimiser.

Un de ces efforts a été d'incrémenter la résistance à l'isopropanol de *C. beijerinckii* DSM 6423 par les méthodes de la mutagenèse aléatoire et le remaniement

du génome (De Gérando et al., 2016). Bien qu'il ait été possible d'obtenir de souches plus résistantes, la production de solvants n'a pas augmenté.

Une autre option envisagée a été d'introduire dans les bactéries ABE hautement résistantes aux solvants, l'enzyme alcool déshydrogénase primaire/secondaire responsable de la transformation de l'acétone en isopropanol. Malgré que la production d'isopropanol et la réduction de l'acétone aient été reproduites, des problèmes ont été observés au moment de réaliser des essais au niveau pilote. Par exemple, la taux de conversion d'acétone en isopropanol a diminué 50 % à 14 % et ce comportement est du probablement à un déséquilibre d'oxydoréduction, vu que la réaction nécessite du NADPH (Survase et al., 2019).

2.1.2.2 Isolation de souches IBE

En dépit des efforts visant à améliorer génétiquement les bactéries IBE pour incrémenter leur rendement, l'isolation de nouvelles bactéries de type sauvage avec une production d'isopropanol et de butanol plus élevée, génère de l'intérêt en raison des risques liés aux défauts potentiels des microorganismes génétiquement modifiés, lors de l'évaluation des technologies de fermentation (Mariano et al., 2015).

La plupart des bactéries IBE isolées rapportées dans la littérature ont été obtenues à partir du sol : herbe, sol contaminé par du diesel et sol avec l'herbe décomposée (Zhang et al., 2018; Youn et al., 2016; Xin et al., 2017), à l'exception de celle trouvée à partir des grains broyés de blé, gramme, orge et millet (Dalal et al., 2019). Celle identifiée comme *C. beijerinckii* BGS1 a donné les meilleurs résultats en produisant 10,2 g/L de butanol et 3,4 g/L d'isopropanol. Le Tableau 2.3 montre les résultats des différentes souches IBE isolées.

Tableau 2.3 Résultats fermentations IBE avec souches isolées

Souche isolée	Sucre	Conc. initiale de sucres (g/L)	Consom. sucres (%)	Temps (h)	Acétone (g/L)	IPA (g/L)	ÉtOH (g/L)	BuOH (g/L)	Rend. BuOH	Réf.
<i>C. beijerinckii</i> <i>optinoii</i>	Glucose	50	45,3	96	ND	~ 3,00	N	5,02	0,229	(Yang et al., 2016)
<i>C. beijerinckii</i> BGS1	Glucose	60	83	48	ND	3,4	N	10,2	0,204	(Zhang et al., 2018)
<i>Clostridium</i> sp. A1424	Glucose	60	77	32	ND	4,49	N	9,43	0,200	(Youn et al., 2016)
<i>Clostridium</i> sp. NJP7	Glucose	60	34	48	0,93	0,55	N	5,14	0,130	(Xin et al., 2017)
<i>C. beijerinckii</i> C- 01	Glucose	30	93	72	ND	2,5	N	7,5	0,267	(Dalal et al., 2019)

Rend. BuOH (g BuOH/g glucose consommé)

ND : Non détecté N : Négligeable selon les auteurs

Il est possible de remarquer qu'il n'y a pas une consommation complète de glucose dans les fermentations avec une concentration initiale de 60 g/L, variant entre 34 % et 83 %.

2.1.2.3 Fermentations IBE à partir de substrats lignocellulosiques

La biomasse lignocellulosique peut être utilisée comme substrat moins coûteux pour la production de biobutanol en raison de ses nombreux avantages tels que la disponibilité en abondance et l'absence de concurrence avec la chaîne alimentaire (Prakash et al., 2016). Cependant, la biomasse lignocellulosique doit être prétraitée pour libérer les polymères en C6 et C5 (cellulose et hémicellulose) de la lignine et hydrolysées en sucres simples, avant tout procédé de fermentation.

Le prétraitement vise à modifier la taille et la structure macroscopique et microscopique de la biomasse ainsi que sa composition chimique submicroscopique, afin de faciliter l'hydrolyse enzymatique de la fraction glucidique en sucres monomères. Il permet aussi de perturber ou séparer la lignine du composant hémicellulose de la biomasse (Ezeji et al., 2010).

Le prétraitement est une étape critique du processus d'utilisation des biomasses, car il peut représenter jusqu'à 30 % du coût total de production. Le prétraitement peut être physique, physico-chimique, chimique et / ou biologique.

Le tableau 2.4 regroupe les différents types de prétraitement et les effets sur la biomasse lignocellulosique.

Tableau 2.4 Différents prétraitements pour la biomasse lignocellulosique

Type de prétraitement	Prétraitement	Effets	Réf.
Physique	Broyage	<ul style="list-style-type: none"> Facilite la manipulation. Augmente la surface spécifique disponible. Réduit à la fois le degré de polymérisation (DP) et la cristallinité de la cellulose. 	(Harmsen et al., 2010; Agbor et al., 2011)
	Hydrothermique	<ul style="list-style-type: none"> Hydrolyse de l'hémicellulose et élimination partielle de la lignine, rendant la cellulose plus accessible. Formation d'inhibiteurs pour la fermentation. 	
	Acide dilué	<ul style="list-style-type: none"> Hydrolyse de l'hémicellulose. Augmente la porosité et améliore la digestibilité enzymatique. Formation d'inhibiteurs pour la fermentation. Altération modérée de la structure de la lignine. 	
Chimique	Alcalin	<ul style="list-style-type: none"> Gonflement de la biomasse, ce qui augmente la surface interne et diminue le degré de polymérisation et la cristallinité de la cellulose. Élimination de la lignine. 	(Harmsen et al., 2010)
	Organosolv	<ul style="list-style-type: none"> Élimination de la lignine. La lignine enlevée, a une haute qualité qui pourrait faciliter son application pour la production des autres produits chimiques. Hydrolyse de l'hémicellulose. 	
	Délignification oxydative	<ul style="list-style-type: none"> Élimination de la lignine. Dégradation de l'hémicellulose. Diminution de la cristallinité de la cellulose. 	
	Liquides ioniques	<ul style="list-style-type: none"> Séparation de la lignine. Incrément de l'accessibilité de la cellulose dans les conditions ambiantes, sans utilisation des solutions acides ou alcalines. 	
Physico-chimique	Explosion à la vapeur	<ul style="list-style-type: none"> Dégradation de l'hémicellulose. Perturbation de la matrice de la lignine. Formation des inhibiteurs pour la fermentation. 	
	Explosion à l'ammoniac (AFEX)	<ul style="list-style-type: none"> Élimination de la lignine. Dégradation de l'hémicellulose. Diminution de la cristallinité de la cellulose. 	
	Explosion au CO ₂	<ul style="list-style-type: none"> Hydrolyse de l'hémicellulose. Perturbation de la structure de la biomasse, en augmentant la surface spécifique disponible. 	
Biologique	Biologique	<ul style="list-style-type: none"> Dégradation de l'hémicellulose et de la lignine 	

L'étape de prétraitement est suivie de l'hydrolyse effectuée par un acide ou par un groupe d'enzymes. Le procédé d'hydrolyse acide est moins cher et plus rapide que l'hydrolyse enzymatique, mais l'acide lui-même est toxique pour l'environnement et nuisible pour les cellules. Il nécessite également une étape de détoxification pour éliminer certains inhibiteurs tels que les acides faibles, les dérivés du furane et les composés phénoliques (Ibrahim et al., 2017). À contrario, l'hydrolyse enzymatique est très spécifique, nécessite une faible énergie, les rendements de conversion sont plus élevés, ne conduit pas à la corrosion et son impact environnemental est inférieur à celui de l'hydrolyse acide. De plus, il n'y a pas de génération d'inhibiteurs (Morone et al., 2014).

Il est important de différencier l'hydrolyse des celluloses et l'hydrolyse d'hémicelluloses, parce que cette dernière a une structure principalement amorphe, contrairement à la structure cristalline de la cellulose.

Au cours de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose, au moins trois types d'enzymes, connues sous le nom de cellulases, sont utilisées : les endoglucanases, les exoglucanases, également appelées cellobiohydrolases et les β -glucosidases. D'abord, les endoglucanases dégradent les parties de la cellulose avec une faible cristallinité et génèrent des extrémités de chaîne libres, qui peuvent ensuite être modifiées par les exoglucanases pour retirer les unités de cellobiose des extrémités de la chaîne. Finalement, les β -glucosidases hydrolysent le cellobiose en glucose (García et al., 2011). La figure 2.3 représente l'activité enzymatique dans la cellulose, modifiée (Aro et al., 2005).

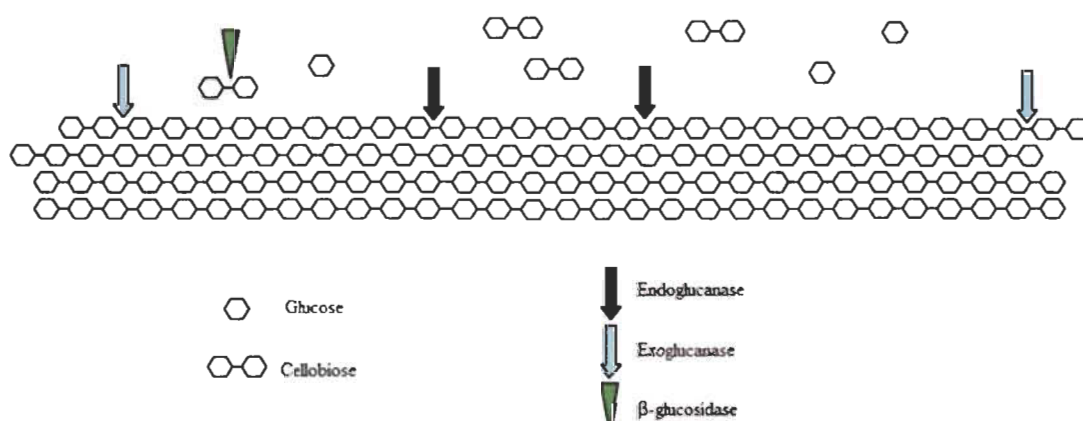


Figure 2.3 Schéma de l'activité enzymatique des cellulases

Lors de l'hydrolyse enzymatique, il est aussi nécessaire de contrôler le pH pour un bon fonctionnement de l'enzyme. Généralement, le tampon citrate est utilisé dans les hydrolyses enzymatiques de substrats lignocellulosiques, mais des études récentes montrent qu'il inhibe la croissance de souches productrices d'ABE comme *C. acetobutylicum* ATCC 824 et *C. beijerinckii* NCIMB 8052 (Liu et al., 2015). Pour surmonter cette problématique, l'utilisation du tampon acétate au lieu du tampon citrate, pourrait être une possibilité d'améliorer la production de la fermentation IBE (dos Santos Vieira et al., 2019).

Dans le cas de l'hydrolyse d'hémicellulose, celle-ci est produite par l'action concertée des endo-enzymes pour diviser intérieurement la chaîne principale, des exo-enzymes pour libérer les sucres monomériques et des enzymes auxiliaires pour couper les chaînes latérales des polymères ou des oligosaccharides en conduisant à la libération de divers mono et disaccharides, selon le type d'hémicellulose (Aro et al., 2005).

En général, le résultat de l'hydrolyse enzymatique dépendra de la qualité et la concentration du substrat, les méthodes de prétraitement utilisées, la charge enzymatique, l'activité des enzymes et les conditions d'hydrolyse comme le pH, la température et l'agitation.

Finalement, pour l'étape de la fermentation, il existe très peu d'études dans la littérature sur la fermentation IBE à partir de substrats lignocellulosiques. Parmi les substrats utilisés figurent la sciure d'eucalyptus, la parche du café, la paille de riz et la bagasse de manioc. Les résultats sont variables en raison des différentes techniques utilisées pendant la fermentation. Le tableau 2.5 rassemble les résultats des différentes études.

Tableau 2.5 Résultats des fermentations IBE à partir de substrats lignocellulosiques

Souche	Substrat	Consom. sucres (%)	Temps (h)	Acétone (g/L)	IPA (g/L)	ÉtOH (g/L)	BuOH (g/L)	Rend. BuOH	Réf.
<i>C. beijerinckii</i> C-01 (Isolée)	Paille de riz	97	72	ND	2,5	ND	6,0	0,234	(Dalal et al., 2019)
		Glucose							
<i>C. beijerinckii</i> DSM 6423	Sciure d'eucalyptus	51 ± 7 Xylose 70 ± 5	48	ND	4,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	4,2 ± 0,5	0,15 ± 0,01	(Cebreiros et al., 2019)
<i>C. beijerinckii</i> DSM 6423	Parche de café	67	48	ND	2,2	ND	4,4	0,31	(Procentese et al., 2018)
<i>C. beijerinckii</i> ATCC 6014	Bagasse de manioc	80 (glucose et xylose)	63	ND	6,69	ND	12,31	0,303	(Zhang et al., 2016)

Rend. BuOH (g BuOH/g glucose consommé)

ND : Non détecté

Chapitre 3 - Objectifs du projet

3.1 But du projet

Le coût élevé des substrats et la formation de sous-produits comme l'acétone et l'éthanol pendant la fermentation acétone-butanol-éthanol (ABE), nuisent à la rentabilité de la production à grande échelle du biobutanol. Une stratégie pour accroître la rentabilité du procédé serait de convertir l'acétone en un produit à plus forte valeur ajoutée, tel que l'isopropanol.

L'utilisation des substrats alternatifs comme des résidus lignocellulosiques prétraités peut aussi aider à l'amélioration de la rentabilité. Le but du projet est donc d'étudier le procédé de fermentation isopropanol-butanol-éthanol (IBE), en utilisant la souche *Clostridium beijerinckii* DSM 6423 dans un milieu de culture semi-synthétique et dans un milieu de culture complexe et alternative que contient un hydrolysate obtenu à partir de tiges de maïs prétraitées.

3.2 Hypothèses

Selon la revue de littérature, les hypothèses suivantes sont formulées:

3.2.1 Concentration de glucose

Hypothèse 1 : La concentration initiale de glucose affecte la production de butanol.

Dans les fermentations ABE en discontinu, un excès de sucres est indispensable pour commencer et maintenir la production de solvants ainsi que pour éviter la production des acides en excès sans passage vers la phase solvantogène. Il est important de confirmer si ce comportement se présente aussi dans la fermentation IBE.

3.2.2 Consommation du glucose et production de butanol

Hypothèse 2 : Le contrôle du pH favorise la consommation du glucose ainsi que la production de butanol.

Pendant la phase acidogène, la formation rapide des acides acétique et butyrique entraîne une diminution du pH. La phase solvantogène commence lorsque le pH atteint un point critique, au-delà duquel les acides sont réassimilés et des solvants sont produits. Pour cette raison, un pH bas est possiblement une condition nécessaire pour la production de solvants, tandis qu'une stratégie de contrôle du pH appropriée est la clé d'une production de biobutanol stable et efficace. Différentes stratégies sont envisagées à cette fin.

Hypothèse 3: L'ajout de butyrate au milieu de culture améliore la production de butanol.

L'amélioration de la production de butanol est associée aux forces métaboliques du cycle de formation et ré assimilation du butyrate. L'ajout de butyrate extracellulaire modifierait les profils, les forces et même les directions des réactions présentes dans ce cycle de la bactérie *C. beijerinckii* DSM 6423.

Hypothèse 4 : Dans un milieu semi-synthétique contenant un mélange des sucres similaires aux sucres du bois de bouleau jaune, la bactérie C. beijerinckii DSM 6423 aura une préférence pour consommer le glucose.

Le glucose et la xylose sont les sucres les plus abondants dans les hydrolysats de la biomasse lignocellulosique. Cependant, la fermentation de la xylose est limitée par la préférence des micro-organismes pour le glucose comme source de carbone et d'énergie.

3.2.3 La tige de maïs en tant que source de sucres fermentables

Hypothèse 5 : La tige de maïs prétraitée et hydrolysée, comme source de sucres fermentables dans un milieu de culture, permet la croissance de la bactérie C. beijerinckii DSM 6423.

La tige de maïs est une source intéressante de cellulose, qui après une hydrolyse enzymatique, peut être utilisée par la bactérie *C. beijerinckii* DSM 6423 comme source de

carbone. Cependant, la croissance de cette bactérie peut être affectée par la présence des éléments toxiques générés pendant le prétraitement. Il est nécessaire de comparer la croissance de cette bactérie dans un milieu synthétique et dans un milieu contenant l'hydrolysats.

3.3 Objectifs

Afin d'atteindre le but du projet et de vérifier les hypothèses, les objectifs suivants sont proposés:

- Étudier la production de butanol avec une souche IBE de référence dans un milieu semi-synthétique.
- Analyser le comportement de la souche IBE en présence de glucose ou d'un mélange de sucres similaire aux sucres présents dans le bois de bouleau jaune.
- Produire un hydrolysats à partir de la tige de maïs prétraitée.
- Utiliser l'hydrolysats de la tige de maïs comme source de carbone bon marché pour la fermentation IBE.
- Évaluer la production de biobutanol avec une souche IBE dans un milieu complexe et alternatif contenant l'hydrolysats obtenu à partir la tige de maïs.

L'originalité de ce projet réside dans le fait que la fermentation IBE sera étudiée avec une perspective différente de celle présentée dans les rares travaux disponibles. Par exemple, chercher à comprendre pourquoi la consommation de glucose est limitée et l'impact du pH sur la fermentation à travers différentes stratégies et pas simplement d'imiter ce qui a été fait avec la fermentation ABE. De plus, le comportement de la bactérie *C. beijerinckii* DSM 6423 sera étudié en présence d'un mélange de sucres et dans un milieu de culture alternatif et complexe, puisque la plupart des études disponibles n'ayant été réalisées qu'avec le glucose comme source de carbone.

Chapitre 4 - Matériels et méthodes

4.1 Fermentations IBE avec la souche de référence

4.1.1 Souche de référence *Clostridium beijerinckii* DSM 6423

La bactérie *C. beijerinckii* DSM 6423 a été fournie par « German Collection of Microorganisms and Cell Cultures » et son activation a été effectuée selon le protocole décrit par le fournisseur.

4.1.2 Milieu de préculture et de fermentation

Le milieu TYA a été choisi pour conduire la préculture et les fermentations. La composition et la préparation du milieu sont décrites dans l'annexe A.1.

4.1.3 Préculture

La préparation et l'inoculation de la préculture ont été effectuées à l'intérieur d'une chambre anaérobie avec atmosphère contrôlée (modèle 855-AC, Plas-Labs, Inc). La chambre était dotée d'une unité de chauffage et un cartouche contenant un catalyseur au palladium. Pour son fonctionnement, elle devrait être purgée avec un mélange de gaz : 85 % N₂, 10 % H₂ et 5 % CO₂. Après la purge et pour confirmer l'absence d'oxygène, une lecture avec un analyseur d'oxygène (CheckPoint O₂/CO₂, Dansensor) a été faite. La température à l'intérieur de la chambre a été fixée à 35 °C et la technique Hungate a été utilisée pour purger les seringues avec le gaz sans oxygène, avant de procéder à tout prélèvement.

Dans une bouteille sérum de 500 ml contenant le milieu TYA, 20 ml d'une solution de glucose 600 g/L ont été ajoutés pour avoir une concentration initiale de 60 g/L. 1,5 ml de la souche *C. beijerinckii* DSM 6423 préservée à -80 °C, déjà dégelée, ont été inoculés. Pour garantir l'homogénéisation du milieu, une agitation manuelle a été effectuée, avant de faire le prélèvement correspondant au t = 0 h.

Dans le cas d'une fermentation avec le mélange de sucres, la solution de glucose à 600 g/L a été remplacée par un mélange de sucres : glucose 400 g/L, xylose 170 g/L, mannose 31 g/L, galactose 8 g/L et arabinose 5 g/L pour simuler la composition en sucres du bois de bouleau jaune (Benali et al., 2019).

La bouteille est placée à l'intérieur d'une jarre anaérobie (Oxoid, Thermo Fisher Scientific) de 2,5 L de capacité avec un sachet générateur de gaz (GasPak, BD) et un indicateur d'absence d'oxygène. Finalement, la jarre est placée dans un agitateur orbital (MaxQ 4000, Thermo Scientific) avec une agitation de 150 tr/min et une température de 35 °C.

Après avoir complété une étude de croissance sur la préculture, le temps choisi pour faire l'inoculation des fermentations était de 24 h, car les bactéries se trouvent dans la phase de croissance. Le pH initial de la préculture est généralement autour de $6,8 \pm 0,1$.

4.1.4 Fermentations

4.1.4.1 Fermentations sans contrôle de pH

La procédure a été similaire à celle de la préculture, jusqu'au moment de l'inoculation : 2 ml (1 % v/v) de la préculture âgée de 24 h ont été inoculés dans le milieu, suivi d'une homogénéisation manuelle avant de faire le prélèvement au début ($t = 0$ h).

La bouteille a été mise à l'intérieur d'un jar anaérobie comme celui de la préculture avec le même type de sachet générateur de gaz et le même indicateur, pour finalement être placée dans l'agitateur orbital décrit ci-dessus, avec une agitation de 150 tr/min et une température de 35 °C.

Les prélèvements ont été faits aux temps de 0 h, 4 h, 24 h, 28 h, 48 h, 72 h, 96 h, 144 h ou selon le besoin, sans dépasser le 10% du volume de travail.

Le pH initial des fermentations a varié selon les expériences.

4.1.4.2 Fermentations avec contrôle de pH

Ces fermentations ont été réalisées dans un réacteur (BioFlo 110, New Brunswick) avec un volume de travail de 1 L et en utilisant NaOH 1N et H₂SO₄ 1N pour contrôler le pH.

D'abord, le milieu TYA était chauffé à 35 °C pendant 30 minutes avant de faire le calibrage de la sonde d'oxygène. Une fois le calibrage fait, l'azote de haute pureté a été barboté pendant 1 h avec un débit de 1 cm³/min. Avant cela, 100 ml d'une solution de glucose 600 g/L ont été ajoutés, suivi de 20 ml de la préculture âgée de 24 h.

Le contrôle du pH a commencé une fois que la fermentation est passée de la phase acidogène à la phase solvantogène, c'est-à-dire quand le pH du milieu a arrêté de diminuer pour commencer à augmenter tranquillement.

Pour garantir l'absence d'oxygène, l'azote de haute pureté a été barboté avec un débit de 1 cm³/min pendant toute la durée de la fermentation

4.1.5 Suivi de la croissance bactérienne

Pour évaluer la croissance bactérienne, la densité optique a été utilisée et mesurée à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV (UV-Vis, Shimadzu).

Après le prélèvement, l'échantillon a été séparé en deux : la partie utilisée pour le blanc où le diluant a été centrifugé à 10000 tr/min pendant 5 minutes (IEC-CL31R multivitesse, Thermo). Le restant a servi pour mesurer la densité optique. Une fois la lecture faite, l'échantillon a été récupéré et centrifugé à nouveau pour les analyses HPLC et GC.

4.1.6 Mesure de pH

Pour les fermentations dans les bouteilles serum, le pH a été mesuré à chaque prélèvement à l'aide d'un pH-mètre (Accumet AB150, Fisher Scientific) avant la lecture de la densité optique.

Pour les fermentations avec contrôle de pH, les valeurs de pH ont été enregistrées à l'aide d'un enregistreur de données (GL820, GraphTech).

4.1.7 Méthodes analytiques

4.1.7.1 Chromatographie en phase liquide à haute performance

Les concentrations de sucres monomères, acide acétique, butanol et éthanol, ont été mesurées à l'aide d'un chromatographe en phase liquide à haute performance (LC-10AT vp, Shimadzu). Les conditions de chromatographie utilisées pour analyser les différents analytes sont regroupées dans le tableau 4.1.

Tableau 4.1 Conditions de la chromatographie en phase liquide à haute performance

Phase mobile	0,005 M H₂SO₄
Colonne	Aminex HPX-87H 300 x 7.8 mm + colonne de garde Carbo H
Détecteur	Indice de réfraction à 55 °C
Température colonne	65 °C
Volume d'injection	20 µl
Débit	0,6 ml/min
Temps d'analyse	60 minutes

Les échantillons analysés ont été dilués dans l'eau milli-Q.

4.1.7.2 Chromatographie en phase gazeuse

Les concentrations d'acides organiques et de solvants ont été mesurées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse CP-3800 de Varian (Canada). Les conditions chromatographiques utilisées pour analyser le butanol, l'éthanol, l'acétone, l'isopropanol, l'acide acétique et l'acide butyrique sont regroupées dans le tableau 4.2.

Tableau 4.2 Conditions de la chromatographie en phase gazeuse

Colonne	ZB-WAX 30m x 0.25 mm, 0.25µm
Température injecteur	225 °C
Débit hélium	5 ml/min
Gradient de température	40 °C pendant 3 min
	140 °C à 20°C/min
	220 °C à 60°C/min
	220 °C pendant 5 min
Temps analyse	14,33 minutes
Détecteur	FID à 300 °C
Volume d'injection	0,3 µl

Deux standards internes (dioxane et l'acide isobutyrique) ont été ajoutés aux échantillons afin de corriger l'erreur du volume d'injection. Le standard interne de dioxane a permis de doser les solvants, tandis que le standard d'acide isobutyrique a permis de doser les acides organiques.

Pour la préparation des échantillons, deux dosages ont été utilisés : i) 0,2 ml de l'échantillon, 0,2 ml de standard interne et complété à 2 ml avec H₂PO₄ (1 % V/V) (FD=10X); ii) 0,4 ml de l'échantillon, 0,2 ml de standard interne, complété à 2 ml avec H₂PO₄ (1 % V/V) (D=5X).

4.1.8 Série de fermentations

Différentes fermentations ont été effectuées dans le but de mieux comprendre le comportement de la souche et aussi d'améliorer le rendement. Le tableau 4.3 montre les expériences réalisées.

Tableau 4.3 Séries de fermentations avec la souche *C. beijerinckii* DSM 6423

Série	Fermentations	Sucre	Concentration initiale	pH initial	But
1	F1-F2	Glucose	20 g/L	6,8	Identifier la concentration en glucose avec le meilleur rendement en butanol
	F3-F4		40 g/L	6,8	
	F5-F6		60 g/L	6,8	
2	C1	Glucose	60 g/L	6,8	Favoriser la consommation totale de glucose : Contrôle, pH initial 5 ou tampon acétate pH 5
	F7-F9		60 g/L	5,0	
	F9-F10		60 g/L	5,5	
3	C2	Glucose	60 g/L	6,5	Favoriser la consommation totale de glucose : Contrôle et ajout de 60 mM de butyrate de sodium
	F11-F12-F13		60 g/L	6,5	
4	C3	Glucose	60 g/L	6,6	Favoriser la consommation totale de glucose : Contrôle et ajout de 5 g/L de CaCO ₃
	F14-F15-F16		60 g/L	6,6	
5	C4	Glucose	60 g/L	6,6	Favoriser la consommation totale de glucose : Contrôle du pH à 5,5
	F17-F18		60 g/L	6,6	
6	F19-F20-F21	Mélange de sucres :			Observer le comportement de la souche en présence d'un mélange de sucres
		Glucose	40 g/L	6,8	
		Xylose	17 g/L		
		Mannose	3 g/L		
		Arabinose	0,50 g/L		
		Galactose	0,8 g/L		

4.2 Substrat agricole

Le substrat agricole utilisé pour les fermentations avec la souche de référence a été la tige de maïs prétraitée fournie par la Chaire de recherche industrielle en environnement et biotechnologie de l'UQTR. Cette tige provient de la ferme Olivier Lépine à St-Alexis-de-Montcalm dans la région de Lanaudière (Québec, Canada). Le prétraitement consistait en une cuisson à l'eau chaude à 180 °C pendant 1 h, suivi d'une hydrolyse alcaline avec l'hydroxyde de sodium (NaOH) à 5% (Duquette et al., 2013).

4.2.1 Hydrolyse enzymatique

La tige de maïs prétraitée a été soumise à une hydrolyse enzymatique en utilisant le cocktail d'enzymes Cellic CTec2 avec une activité enzymatique de 190 FPU/ml (Adney et al., 1996). L'hydrolyse a été effectuée dans des erlenmeyers de 500 ml à 50 °C et à un pH de 4,85, en utilisant une solution tampon 50 mM d'acide acétique – acétate de sodium, avec une agitation de 200 tr/min pendant 87 h. Du polyéthylène glycol 4000 (PEG 4000) a été ajouté comme tensioactif à une dose de 0,05 g/g de maïs prétraité pour améliorer l'hydrolyse de la cellulose. Les charges de solides et d'enzymes étaient de 15 % (p/p) et de 75 FPU/g de cellulose, respectivement. Les surnageants ont été centrifugés à 10000 tr/min plusieurs fois pour éliminer les déchets solides et pasteurisés à 90 °C pendant 10 minutes.

4.2.2 Fermentations

La souche commerciale *C. beijerinckii* DSM 6423 a été utilisée pour la conduite des fermentations.

4.2.2.1 Préculture

La préparation et l'inoculation de la préculture ont été identiques à celles utilisées pour les fermentations avec le glucose et le mélange de sucres, mais avec une concentration en glucose de 40 g/L.

4.2.2.2 Fermentations avec l'hydrolysate

Quarante-sept millilitres de l'hydrolysate pasteurisé ont été ajoutés dans une bouteille sérum de 250 ml contenant 52 ml du milieu TYA, pour avoir une concentration initiale en glucose de 40 g/L. 1 ml (1 % v/v) de la préculture âgée de 24 h a été inoculé dans le milieu, suivi par une homogénéisation manuelle avant de procéder au prélèvement à $t = 0$ h.

La bouteille a été placée à l'intérieur d'une jarre anaérobie (Oxoid, Thermo Fisher Scientific) de 2,5 L de capacité avec un sachet générateur de gaz (GasPak, BD) et un indicateur d'absence d'oxygène. Finalement, le jar a été placé dans un agitateur orbital (MaxQ 4000, Thermo Scientific) avec une agitation de 150 tr/min et une température de 35 °C.

Les prélèvements aux temps de 0 h, 24 h, 47 h, 71 h, et 144 h ont été faits, sans dépasser le 10 % du volume de travail. Le pH n'a pas été contrôlé.

Les méthodes pour le suivi de croissance, du pH et des solvants ont été identiques à celles décrites aux points 3.1.5, 3.1.6 et 3.1.7.

Chapitre 5 - Résultats

5.1 Étude de la fermentation IBE

Vu que très peu de recherches se sont intéressées à la fermentation IBE, les travaux se sont concentrés sur l'identification des principaux paramètres afin d'étudier la fermentation IBE en utilisant la souche *C. beijerinckii* DSM 6423. C'est ainsi que plusieurs paramètres ont été considérés : concentration initiale en glucose, contrôle du pH, ajouts du butyrate de sodium ou du carbonate de calcium, utilisation d'un mélange de sucres synthétiques, etc.

5.1.1 Différentes concentrations de glucose

Le but de cette première série de fermentations a été d'identifier la concentration en glucose offrant le meilleur rendement en butanol et de commencer à identifier, à quel moment, commence la formation des solvants et des acides. Trois concentrations de glucose ont été testées, chacune en duplicata:

- 20 g/L (F1 et F2),
- 40 g/L (F3 et F4),
- 60 g/L (F5 et F6).

Les figure 5.1 à 5.4 montrent les profils pour la consommation de glucose, la production et le rendement du butanol et isopropanol, tandis que la figure 5.5 montre la variation de pH au cours des fermentations. Les valeurs d'éthanol n'ont pas été présentées pour aucune série, car les concentrations étaient si faibles et proches à la limite inférieure de détection (0,1 g/L), rendant leur lecture incertaine et inexploitable.

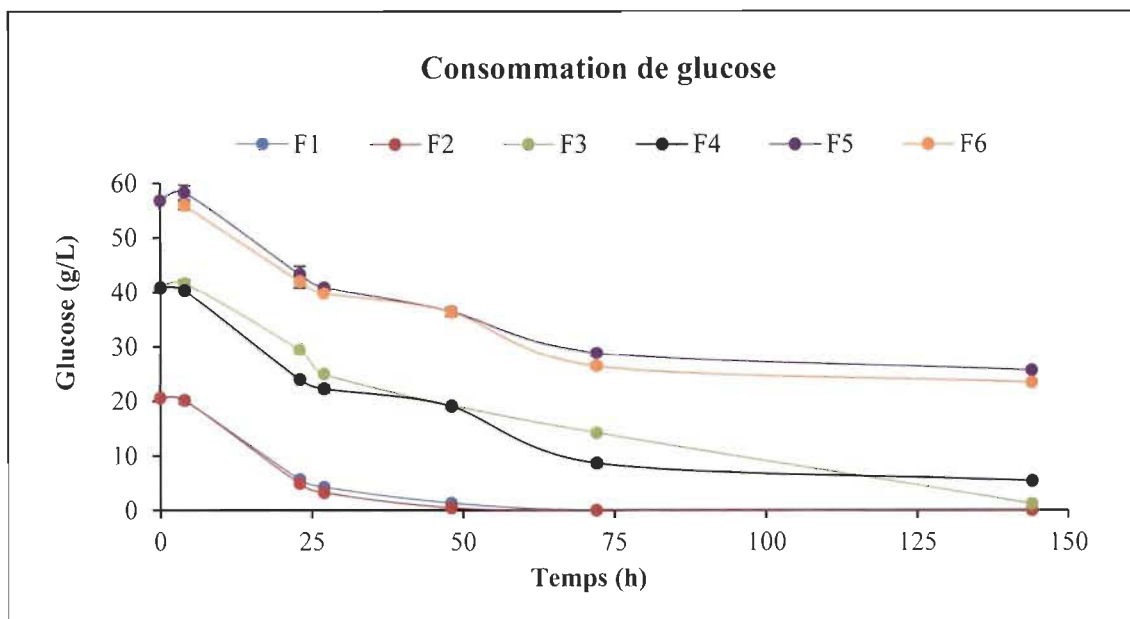


Figure 5.1 Consommation de glucose pour différentes concentrations initiales

F1 et F2 : 20 g/L F3 et F4 : 40 g/L F5 et F6 : 60 g/L

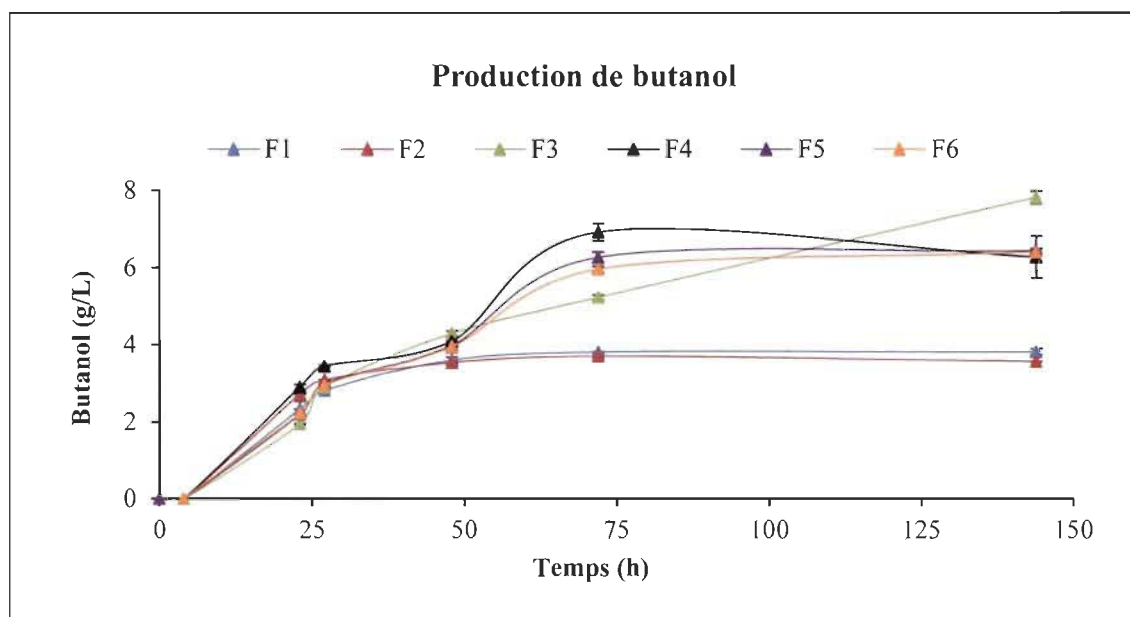


Figure 5.2 Production de butanol pour différentes concentrations initiales de glucose.

F1 et F2 : 20 g/L F3 et F4 : 40 g/L F5 et F6 : 60 g/L

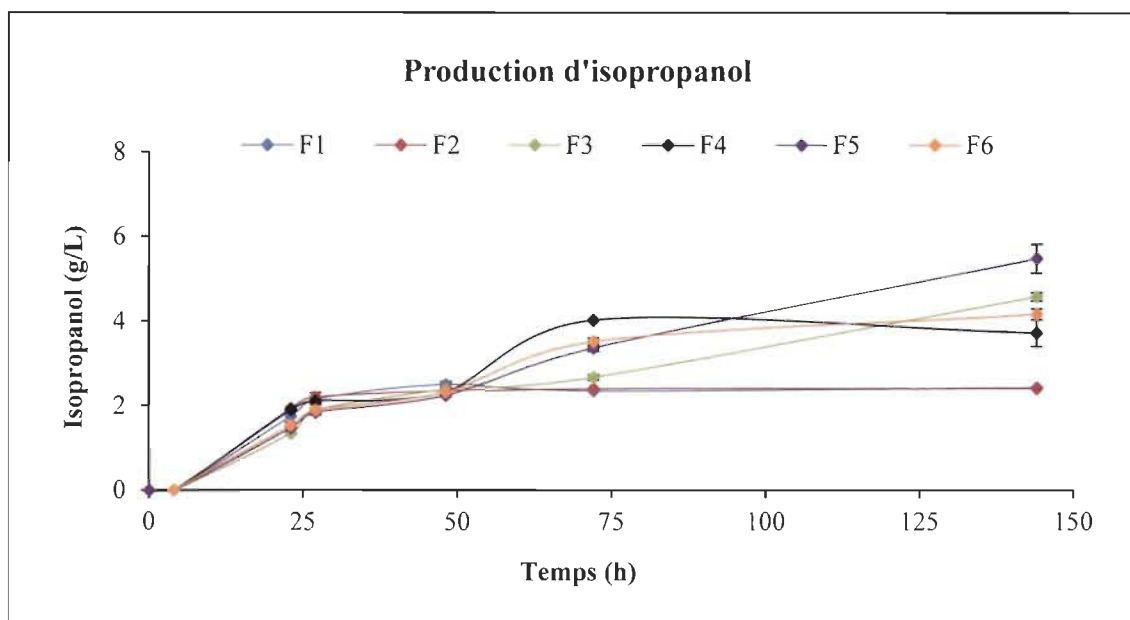


Figure 5.3 Production d'isopropanol pour différentes concentrations initiales de glucose.

F1 et F2 : 20 g/L F3 et F4 : 40 g/L F5 et F6 : 60 g/L

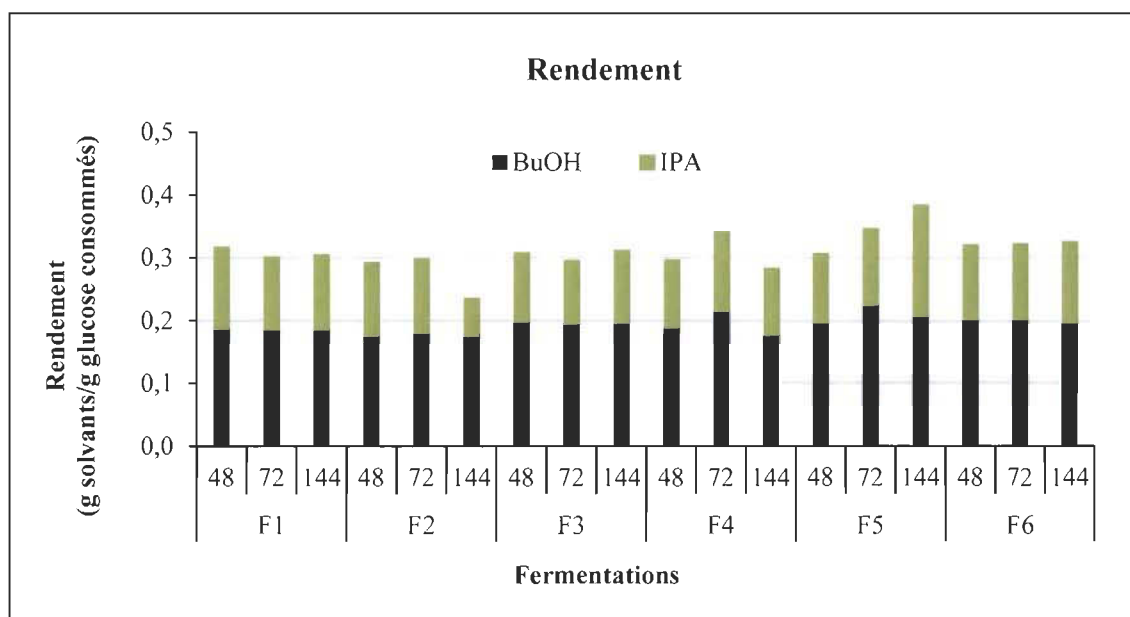


Figure 5.4 Rendement IB pour différentes concentrations initiales de glucose.

F1 et F2 : 20 g/L F3 et F4 : 40 g/L F5 et F6 : 60 g/L

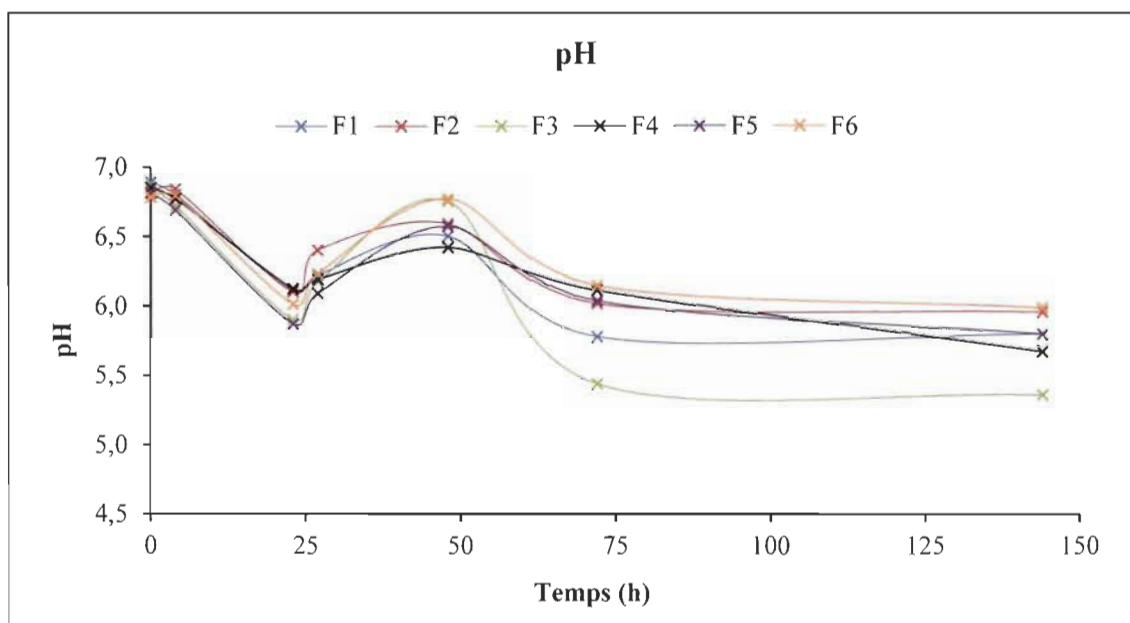


Figure 5.5 Variation du pH avec différentes concentrations initiales de glucose

F1 et F2 : 20 g/L F3 et F4 : 40 g/L F5 et F6 : 60 g/L

Pour cette première série de fermentations, le glucose a été complètement consommé après 144 h, seulement pour les expériences ayant une concentration initiale de 20 g/L. Pour celles d'une concentration de 40 g/L, la consommation a été presque complète (97 % et 87 %), tandis que pour les concentrations initiales plus élevées (60 g/L), la consommation en glucose n'a été que de 54 % et 58 %, respectivement.

Entre 72 h et 144 h, la consommation de glucose pour les fermentations à 60 g/L a quasiment arrêté, mais un comportement différent a été observé pour les fermentations à 40 g/L, puisque pendant cette période, la consommation a continué, spécialement pour la fermentation F3.

À partir de 27 h, il y a eu un incrément du pH dans le milieu, un indicateur que les acides ont commencé à être transformés en solvants. Le rendement en butanol plus élevé a été obtenu dans la fermentation F6 à 72 h (0,225 g BuOH/g glucose consommé), même si le glucose n'a pas été consommé complètement. D'autre part, le comportement de la fermentation F3 qui montre un pH plus bas et un rendement similaire peut suggérer qu'un **pH d'environ 5,4** peut aider à l'assimilation de glucose.

Le tableau 5.1 regroupe les résultats de toutes les fermentations à 72 h, moment où le rendement en butanol a été le plus élevé et le tableau 5.2 regroupe les résultats à 144 h, fin de la fermentation.

Tableau 5.1 Résultats de fermentations avec différentes concentrations de glucose à 72 h

Fermentation	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Glucose initial (g/L)	20,61 ± 0,13	20,60 ± 0,25	41,00 ± 0,37	40,78 ± 0,01	56,77 ± 0,26	55,93 ± 0,73
Glucose restant (g/L)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	14,20 ± 0,10	8,64 ± 0,59	28,88 ± 0,54	26,44 ± 0,44
Consommation glucose (%)	100%	100%	65%	79%	49%	53%
BuOH (g/L)	3,83 ± 0,01	3,72 ± 0,06	5,23 ± 0,06	6,52 ± 0,23	6,26 ± 0,14	5,96 ± 0,08
IPA (g/L)	2,36 ± 0,00	2,41 ± 0,00	2,68 ± 0,06	4,02 ± 0,01	3,36 ± 0,07	3,51 ± 0,08
Rendement BuOH (g/g) ^a	0,186 ± 0,002	0,180 ± 0,005	0,195 ± 0,004	0,215 ± 0,004	0,225 ± 0,012	0,202 ± 0,005
Rendement IPA (g/g) ^b	0,115 ± 0,001	0,117 ± 0,001	0,100 ± 0,001	0,125 ± 0,001	0,121 ± 0,006	0,119 ± 0,002
Rendement IB (g/g) ^c	0,300 ± 0,002	0,297 ± 0,007	0,295 ± 0,005	0,340 ± 0,005	0,345 ± 0,018	0,321 ± 0,007

a. g BuOH/g de glucose consommé, b. g IPA/g de glucose consommé, c. (g BuOH + g IPA)/g de glucose consommé

Tableau 5.2 Résultats de fermentations avec différentes concentrations de glucose à 144 h

Fermentation	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Glucose initial (g/L)	20,61 ± 0,13	20,60 ± 0,25	41,00 ± 0,37	40,78 ± 0,01	56,77 ± 0,26	55,93 ± 0,73
Glucose final (g/L)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	±	±	±	±
Consommation glucose (%)	100%	100%	97%	87%	55%	58%
BuOH (g/L)	3,83 ± 0,08	3,58 ± 0,00	7,82 ± 0,16	6,28 ± 0,54	6,44 ± 0,06	6,41 ± 0,05
IPA (g/L)	2,44 ± 0,01	2,42 ± 0,00	4,57 ± 0,10	3,72 ± 0,32	3,47 ± 0,34	4,16 ± 0,13
Rendement BuOH (g/g) ^a	0,186 ± 0,005	0,175 ± 0,000	0,196 ± 0,002	0,177 ± 0,015	0,207 ± 0,001	0,197 ± 0,005
Rendement IPA (g/g) ^b	0,118 ± 0,001	0,119 ± 0,008	0,115 ± 0,001	0,105 ± 0,009	0,111 ± 0,011	0,128 ± 0,006
Rendement IB (g/g) ^c	0,304 ± 0,006	0,294 ± 0,008	0,311 ± 0,004	0,282 ± 0,024	0,318 ± 0,012	0,325 ± 0,012

b. g BuOH/g de glucose consommé, b. g IPA/g de glucose consommé, c. (g BuOH + g IPA)/g de glucose consommé

5.1.2 Fermentations avec pH initial 5 et tampon acétate pH 5

D'après les résultats obtenus lors de la fermentation F6, où le meilleur rendement en butanol a été obtenu à une concentration initiale de 60 g/L de glucose avec seulement une consommation de 58 % et le profil de consommation de glucose observé pendant la fermentation F3, quand le pH du milieu avait une valeur entre 5-5,5, un pH dans cette plage a été testé pour vérifier s'il aiderait à la consommation de glucose tout en maintenant le même rendement en butanol. À cet effet, des essais avec un pH initial de 5 (F7 et F8) et l'utilisation d'un tampon acétate avec un pH 5 (F9 et F10) ont été réalisés.

Un contrôle (C1) a été également effectué avec les mêmes paramètres que la fermentation F6 : concentration de glucose 60 g/L et pH initial de 6,8.

Les figure 5.6 à 5.9 présentent la consommation de glucose, la formation et le rendement du butanol et l'isopropanol. La variation du pH peut être observée sur la figure 5.10.

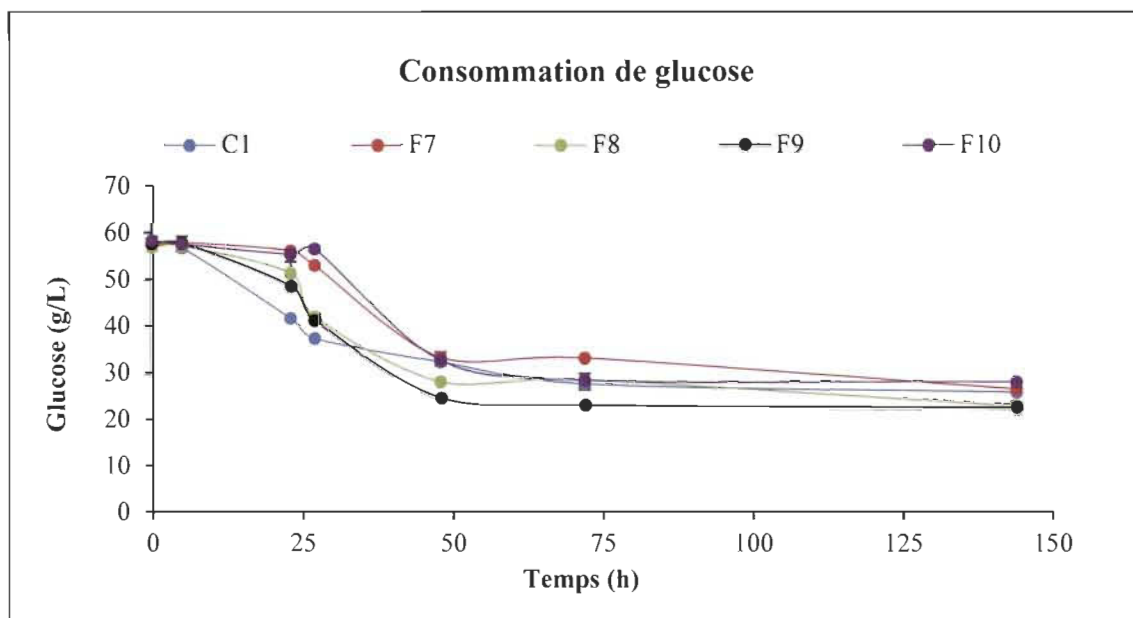


Figure 5.6 Consommation de glucose du contrôle et les fermentations avec un pH initial 5 et tampon acétate.

C1 : Contrôle F7 et F8 : pH initial 5 F9 et F10 : tampon acétate 5

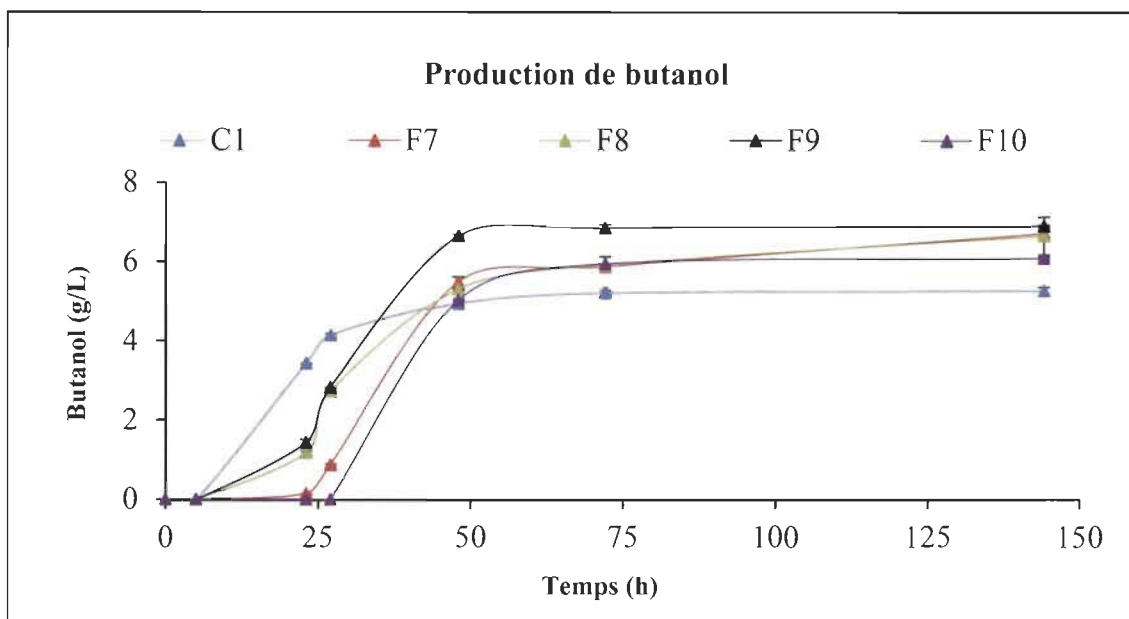


Figure 5.7 Production de butanol pour le contrôle et les fermentations avec un pH initial 5 et tampon acétate.

C1 : Contrôle F7 et F8 : pH initial 5 F9 et F10 : tampon acétate 5

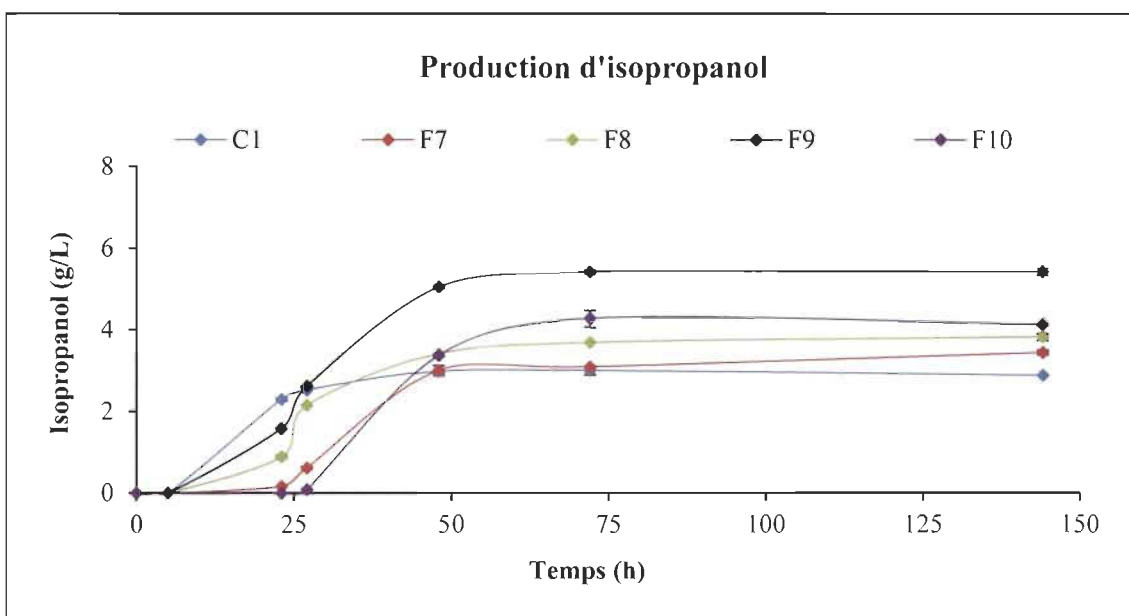


Figure 5.8 Production d'isopropanol pour le contrôle et les fermentations avec un pH initial 5 et tampon acétate.

C1 : Contrôle F7 et F8 : pH initial 5 F9 et F10 : tampon acétate 5

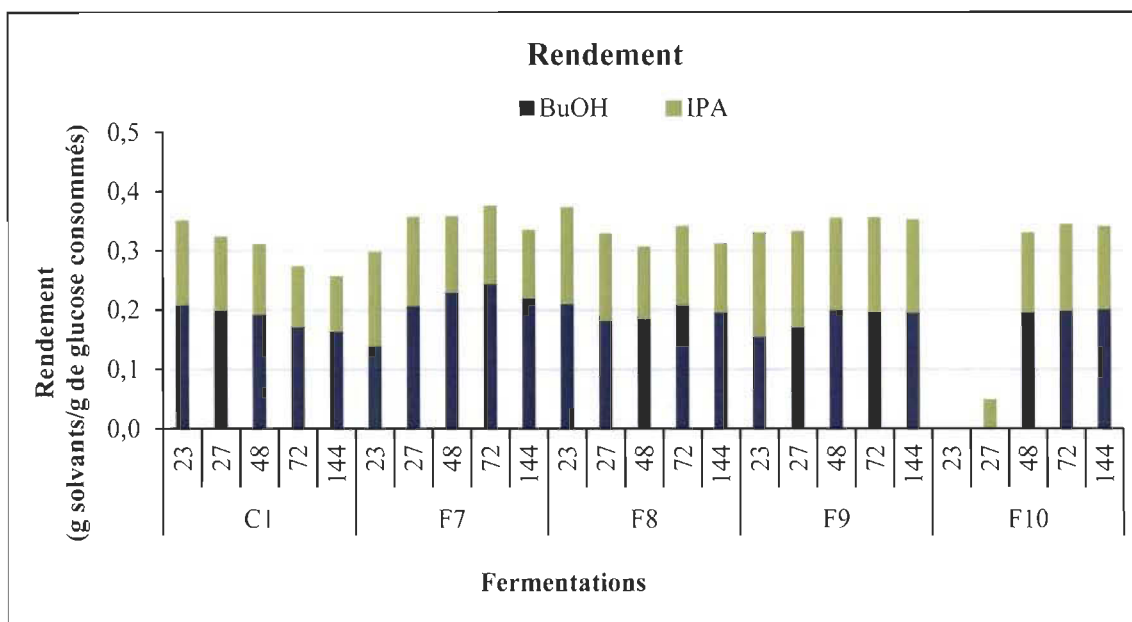


Figure 5.9 Rendement IB pour le contrôle et les fermentations avec un pH initial 5 et tampon acétate.

C1 : Contrôle F7 et F8 : pH initial 5 F9 et F10 : tampon acétate 5

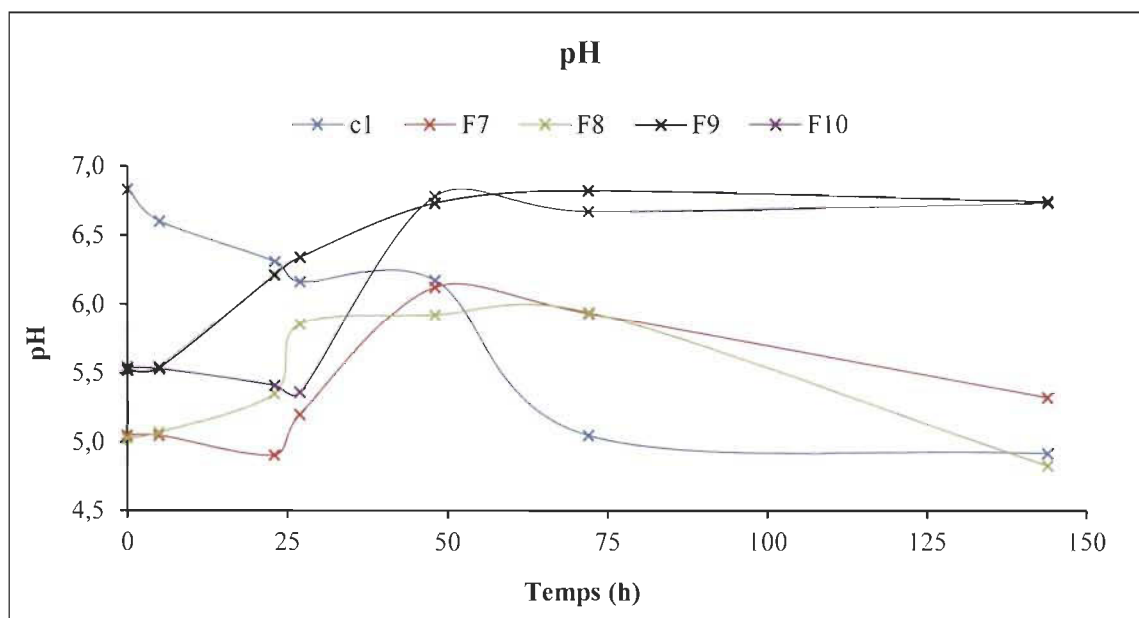


Figure 5.10 Variation du pH pour le contrôle et les fermentations avec un pH initial 5 et tampon acétate.

C1 : Contrôle F7 et F8 : pH initial 5 F9 et F10 : tampon acétate 5

Au niveau de la consommation de glucose, C1 a consommé seulement 55 % de la concentration disponible, une valeur similaire aux expériences F5 et F6. Ce comportement était prévisible, car les conditions étaient identiques. En général et après 144 h, aucune fermentation n'a consommé complètement le glucose, avec des taux de consommation variant entre 52 % et 61 %. Pour les fermentations F9 et F10, la consommation s'est arrêtée à partir de 72 h, tandis que les expériences F7 et F8 ont continué à consommer, même si cela ne s'est pas fait avec la même vitesse qu'au début des fermentations. Le pourcentage de consommation est passé de 0,58 %/h et 0,69 %/h à seulement 0,15 %/h et 0,13 %/h, respectivement.

Par rapport aux solvants, la production a été observée à partir de 24 h, sauf pour la fermentation F10, qui a commencé à 48 h.

Les résultats obtenus ont démontré que les conditions d'un pH initial de 5 ou l'utilisation d'un tampon acétate de sodium 50 mM avec pH 5 n'ont pas favorisé la consommation complète du glucose. Cependant, ces conditions ont eu un impact dans la production du butanol, vu qu'une concentration proche de 6 g/L a été obtenue à 48 h en comparaison à la fermentation F6, où cette concentration de 6 g/L n'a été atteinte qu'après 72 h.

En ce qui concerne le rendement en butanol, la valeur la plus élevée (0,245 g BuOH/g glucose consommé) a été observée dans la fermentation F7 à 72 h, un incrément de 8,8 % par rapport à celui de la fermentation F6. Parallèlement, le rendement plus haut en isopropanol (0,157 g IPA/g glucose consommé) a été obtenu avec l'expérience F9 à 72 h. La présence d'acétate dans le milieu et un pH entre 5 et 5,5 semble favoriser la production d'isopropanol.

Quant au pH, la variation entre les fermentations dans les mêmes conditions n'a pas été similaire (voir 5.10). Pour les fermentations F7 et F8, avec un pH initial de 5, des valeurs de pH supérieures à celles initiales ont été trouvées à partir de 27 h. Une diminution de pH à partir de 72 h a été remarquée, phénomène qu'a été observé aussi dans le contrôle. Pour les fermentations F9 et F10 qui contiennent le tampon acétate, le pH a augmenté

jusqu'à une valeur de 6,82 et 6,78, en sachant que le but était de le garder une valeur autour de 5 – 5,5. Le pH est resté relativement stable à partir de 48 h.

Au niveau de la croissance, la fermentation F7 a pris plus de temps à démarrer que la fermentation F8, mais à partir de 48 h, la densité optique pour les deux, était similaire. Par contre, entre F9 et F10, les différences sont plus importantes. La fermentation F9 a commencé à croître à partir de 24 h, tandis que F10 a commencé sa croissance, seulement à partir 48 h. Les valeurs du pH mesurées pendant les prélèvements ont permis de voir l'impact des différences dans la croissance. Si la valeur de pH mesurée pendant les vingt-sept premières heures est comparée entre F7 et F8, F7 a eu un pH inférieur (5,20), c'est-à-dire, la souche produisait des acides, tandis que F8 a eu une valeur du pH plus élevée (5,85) dans cette même période de temps, ceci étant un indicateur que la souche était déjà en phase de solvantogénèse et elle se trouvait déjà dans la phase stationnaire au lieu de la phase de croissance ou la phase de ralentissement. Une situation identique a été observée entre F9 et F10, la fermentation avec un pH inférieur (F10) a eu une croissance inférieure durant les quarante-huit premières heures, pendant que les valeurs de pH pour F9 ont commencé à croître à partir de 23 h. Le contrôle a eu le comportement attendu, avec la phase acidogène pendant les vingt-quatre premières heures suivi du changement vers la phase solvantogène.

Le "tableau 5.3 montre les résultats des fermentations à 72 h, moment où le meilleur rendement en butanol a été obtenu.

Tableau 5.3 Résultats des fermentations avec pH initial de 5 et tampon acétate pH 5 à 72 h

Fermentation	C1	F7	F8	F9	F10
Glucose (g/L)	58,04 ± 1,12	57,13 ± 0,16	56,87 ± 0,59	57,64 ± 1,41	58,30 ± 0,18
BuOH (g/L)	5,23 ± 0,25	5,88 ± 0,06	5,92 ± 0,00	6,85 ± 0,09	5,95 ± 0,18
IPA (g/L)	3,01 ± 0,11	3,09 ± 0,01	3,68 ± 0,00	5,42 ± 0,06	4,26 ± 0,21
Rendement					
BuOH (g/g)^a	0,173 ± 0,021	0,245 ± 0,006	0,210 ± 0,016	0,198 ± 0,016	0,200 ± 0,017
Rendement					
IPA (g/g)^b	0,099 ± 0,011	0,129 ± 0,002	0,130 ± 0,009	0,157 ± 0,009	0,143 ± 0,015
Rendement					
IB (g/g)^c	0,272 ± 0,033	0,374 ± 0,008	0,340 ± 0,025	0,354 ± 0,025	0,343 ± 0,032

a. g BuOH/g de glucose consommé, b. g IPA/g de glucose consommé, c. (g BuOH + g IPA)/g de glucose consommé

5.1.3 Fermentations avec butyrate de sodium (60 mM)

Contrairement aux recherches sur l'impact de l'ajout de butyrate sur les fermentations ABE, il existe très peu de littérature de son effet sur les fermentations IBE (Zhang et al., 2018; Ávila et al., 2018). Des études ont été effectuées à ce sujet avec la bactérie ABE, *C. beijerinckii* NCIMB 8052 (Lee et al., 2008), et ils ont établi que grâce au butyrate, une augmentation de la production de butanol a été observée. Cela est possiblement dû à une capacité tampon accrue du milieu induit par le butyrate, ce qui aiderait la croissance de la culture tout en empêchant les conditions extrêmement acides. Pour cette raison, 60 mM de butyrate de sodium ont été ajoutés au milieu TYA, une concentration déjà utilisée avec une souche IBE isolée. Cette série comprend un contrôle sans butyrate (C2), mais avec la même concentration de glucose (60 g/L). L'expérience avec ajout de butyrate a été réalisée en triplicata (F11, F12 et F13).

Les figures 5.11 à 5.14 présentent les profils de la consommation de glucose, la production et le rendement en butanol et isopropanol. Les valeurs pour la fermentation F13 à 72 h ne sont pas disponibles.

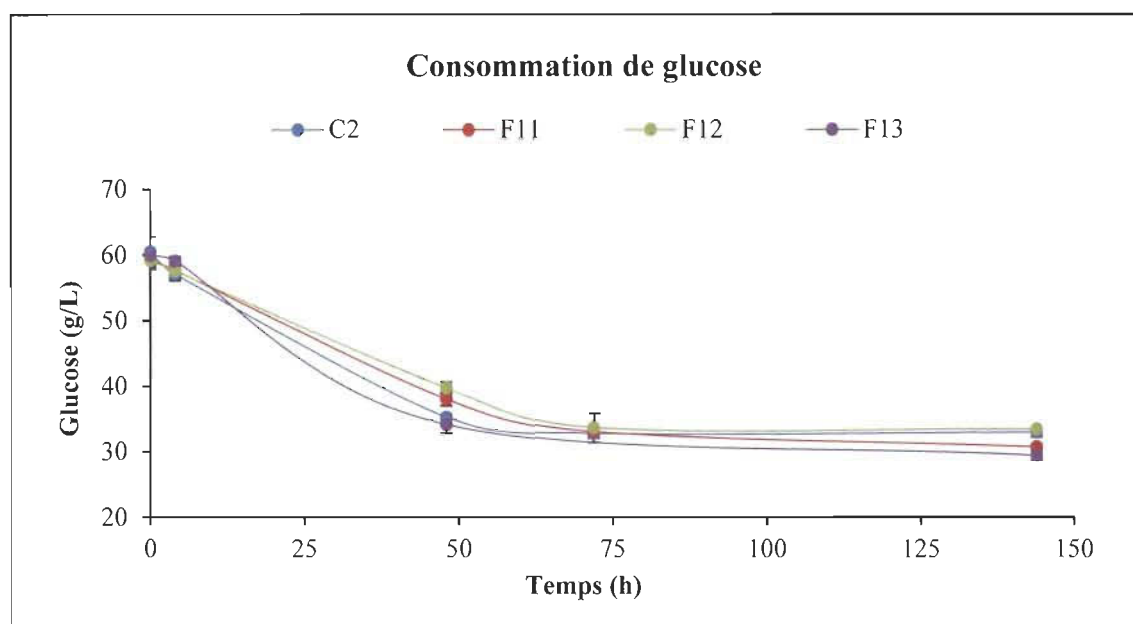


Figure 5.11 Consommation de glucose pour les fermentations avec butyrate de sodium (60 mM)

C2 : Contrôle

F11, F12, F13 : fermentations avec butyrate de sodium

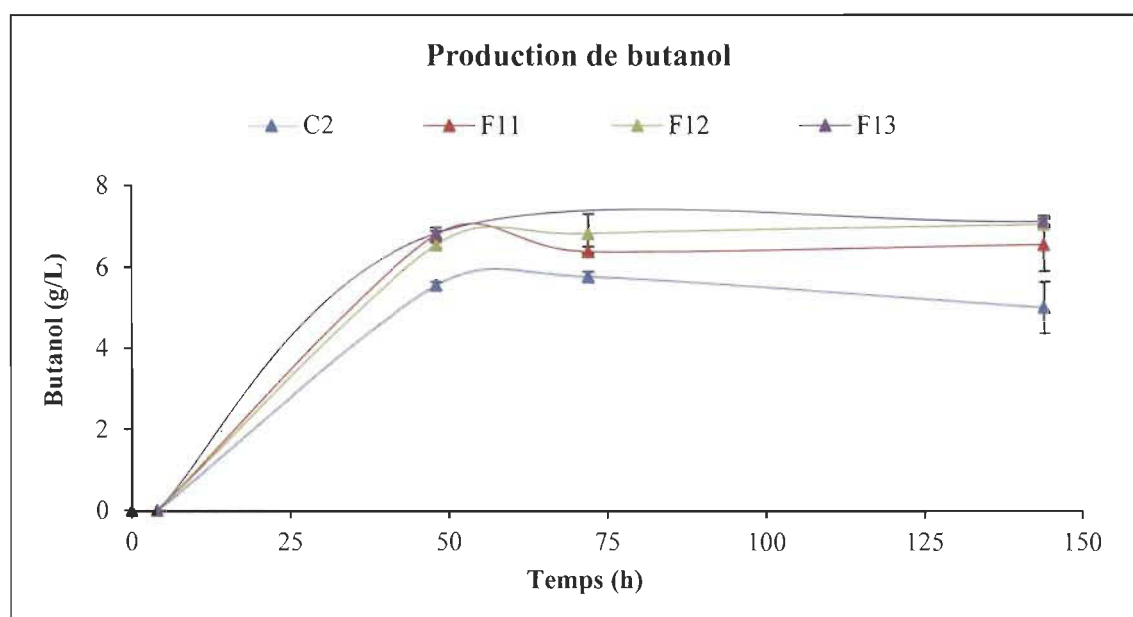


Figure 5.12 Production de butanol pour les fermentations avec butyrate de sodium (60 mM)

C2 : Contrôle

F11, F12, F13 : fermentations avec butyrate de sodium

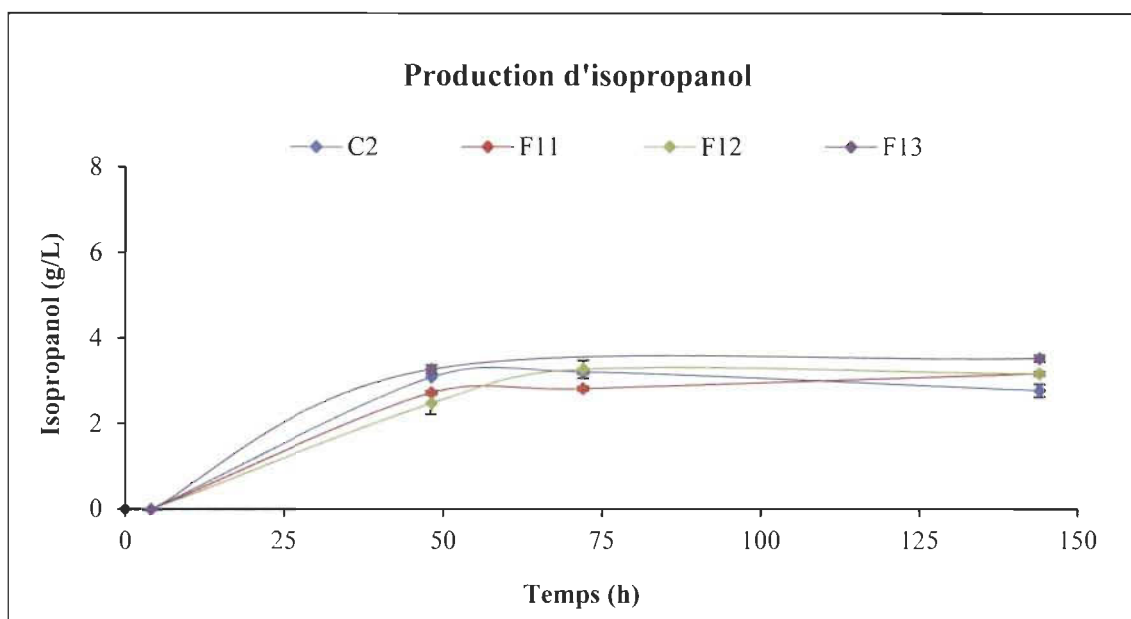


Figure 5.13 Production d'isopropanol pour les fermentations avec butyrate de sodium (60 mM)

C2 : Contrôle F11, F12, F13 : fermentations avec butyrate de sodium

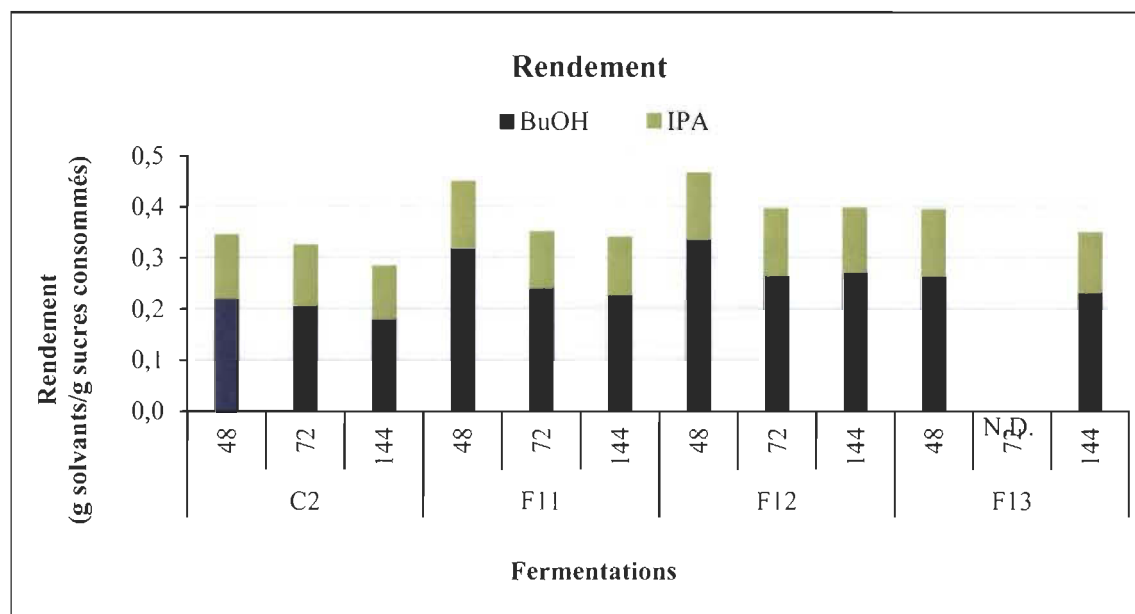


Figure 5.14 Rendement IB pour les fermentations avec butyrate de sodium (60 mM)

C2 : Contrôle F11, F12, F13 : fermentations avec butyrate de sodium

Selon les résultats obtenus, l'ajout de butyrate n'a pas aidé à consommer plus de glucose, mais a aidé à produire plus rapidement le butanol. En effet, après 48 h, la concentration en butanol dans les fermentations F11, F12 et F13 était de 6,78 g/L, 6,53 g/L et 6,82 g/L respectivement, en comparaison avec le contrôle C2 dont la concentration n'était que de 5,55 g/L. De plus, il faut noter qu'après 48 h, il n'y a pas eu une augmentation significative de production de butanol dans aucune des fermentations, mais plutôt une stagnation voire une diminution.

Cette production plus rapide de butanol indique que l'addition de butyrate a permis d'atteindre plus rapidement la concentration d'acide butyrique nécessaire pour passer de la phase acide à la phase de production de solvants. Par conséquent, il faut identifier à quelle concentration d'acide butyrique commence le changement. Cela peut se faire en tenant compte la valeur du pH, car cette dernière détermine la concentration d'acide butyrique non dissocié, un paramètre de grande importance pour la production de butanol (Richter et al., 2012).

Le rendement en butanol plus élevé a été obtenu à 48 h pour les fermentations avec ajout de butyrate et a été supérieur à celui du contrôle. Ainsi, le rendement est passé de 0,221 g BuOH/g glucose consommé (sans butyrate) à 0,308 g BuOH/g glucose consommé (avec ajout de butyrate), ce qui correspond à une augmentation de 39 %.

Toutefois, il est à noter qu'il s'agit d'un rendement surement surestimé, car le fait de ne pas avoir consommé plus de glucose signifie que la plupart de butanol provient de l'acide ajouté et non de celui produit par les bactéries.

À partir de cette série, les concentrations d'acide acétique et d'acide butyrique du milieu ont été mesurées. Les figures 5.15 à 5.17 montrent la variation de pH et les concentrations des acides organiques (acétique et butyrique) pendant les fermentations

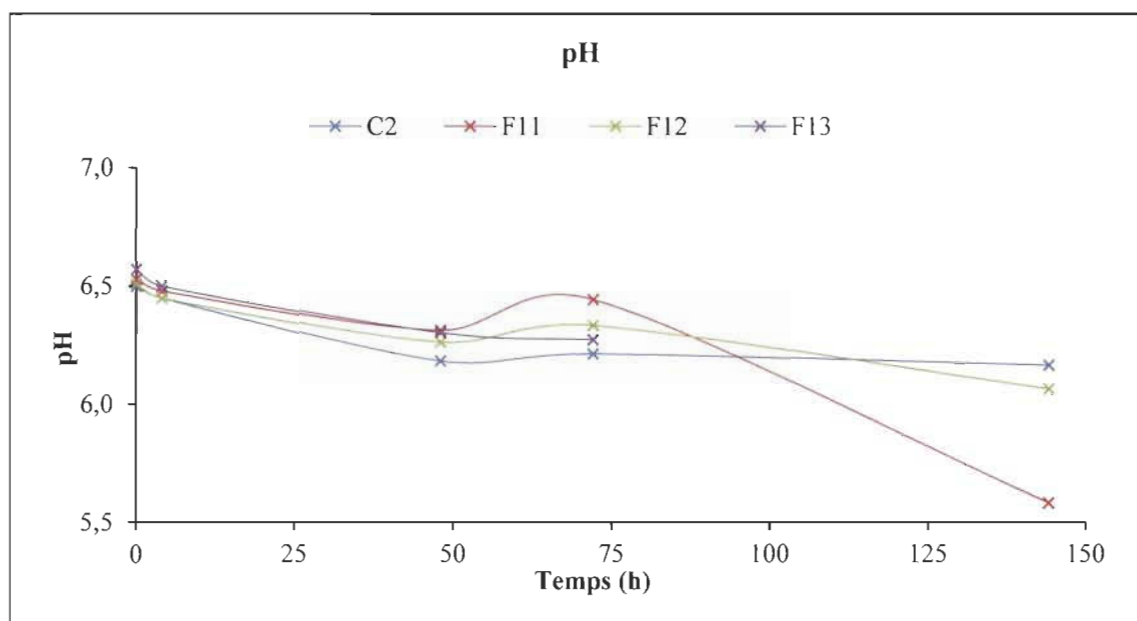


Figure 5.15 Variation du pH des fermentations avec butyrate de sodium (60 mM)

C2 : Contrôle F11, F12, F13 : fermentations avec butyrate de sodium

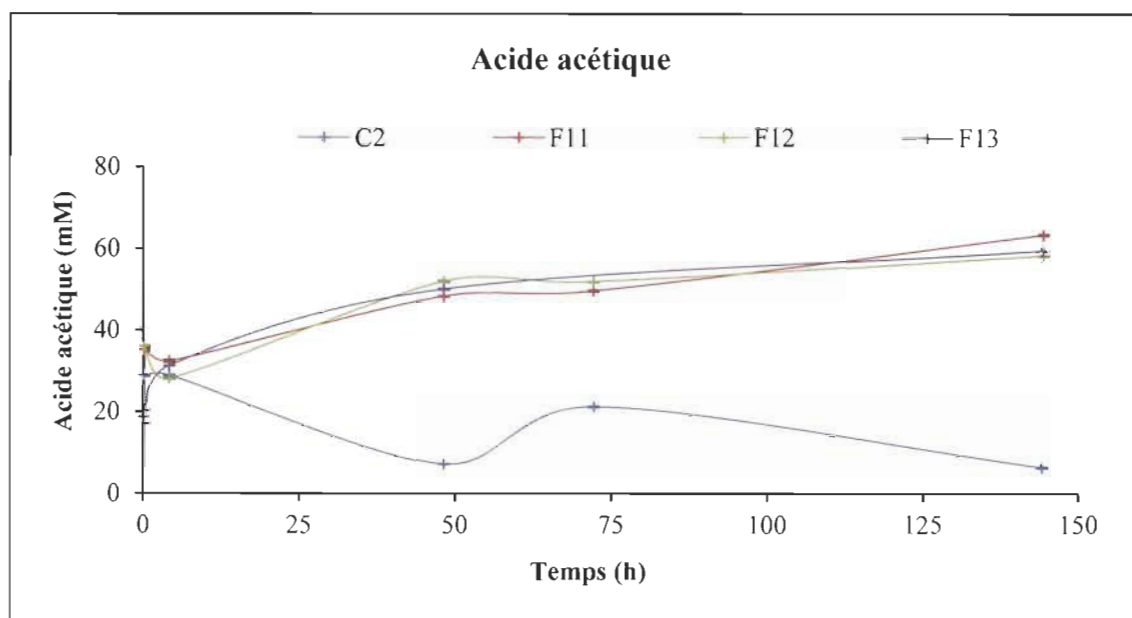


Figure 5.16 Concentration d'acide acétique pour les fermentations avec butyrate de sodium (60 mM).

C2 : Contrôle F11, F12, F13 : fermentations avec butyrate de sodium

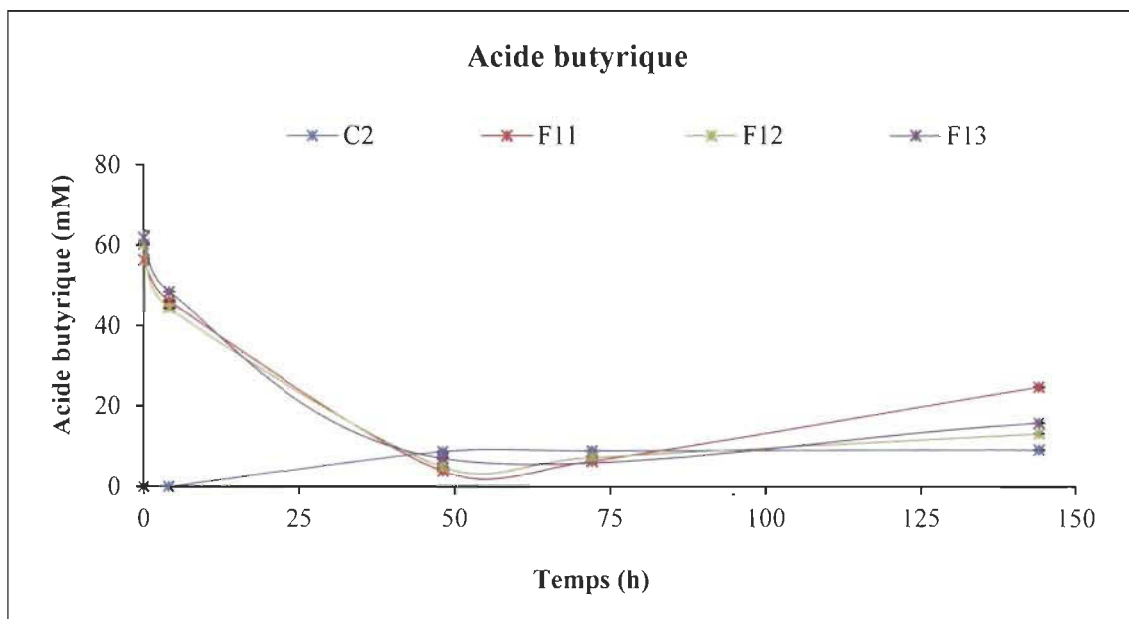


Figure 5.17. Concentration d'acide butyrique pour les fermentations avec butyrate de sodium (60 mM).

C2 : Contrôle F11, F12, F13 : fermentations avec butyrate de sodium

Il peut être observé que le butyrate a contribué à maintenir un niveau plus élevé d'acide acétique dans le milieu par rapport au témoin C2, mais cela n'a pas entraîné une augmentation de la production d'isopropanol. En ce qui concerne l'acide butyrique, la majeure partie de l'acide ajouté a été consommée, avec une augmentation incrémentale de la production après 72 h, contrairement au contrôle où, à partir de 72 h, sa production a arrêté. Le tableau 5.4 compile les résultats des fermentations avec butyrate à 48 h.

Tableau 5.4. Résultats des fermentations avec butyrate (60 mM) à 48 h

Fermentation	C2	F11	F12	F13
Glucose (g/L)	60,50 ± 2,28	59,30 ± 1,45	59,14 ± 0,70	59,89 ± 0,05
Consommation glucose	41%	36%	33%	43%
BuOH (g/L)	5,55 ± 0,20	6,78 ± 0,10	6,53 ± 0,07	6,82 ± 0,15
IPA (g/L)	3,07 ± 0,00	2,71 ± 0,04	2,47 ± 0,04	3,26 ± 0,09
Acide acétique (mM)	6,91 ± 0,06	48,02 ± 0,08	51,70 ± 0,15	49,76 ± 0,13
Acide butyrique (mM)	8,72 ± 0,09	3,81 ± 0,00	4,88 ± 0,03	7,03 ± 0,02
Rendement BuOH (g/g)^a	0,221 ± 0,009	0,320 ± 0,042	0,338 ± 0,031	0,266 ± 0,020
Rendement IPA (g/g)^b	0,122 ± 0,009	0,128 ± 0,017	0,127 ± 0,002	0,127 ± 0,010
Rendement IB (g/g)^c	0,344 ± 0,018	0,448 ± 0,058	0,465 ± 0,034	0,394 ± 0,031

a. g BuOH/g de glucose consommé, b. g IPA/g de glucose consommé, c. (g BuOH + g IPA)/g de glucose consommé

5.1.4 Fermentations avec 5 g/L de carbonate de calcium (CaCO₃)

Lors de la fermentation ABE, des coenzymes telles que NADH et NADPH, jouent un rôle essentiel dans la croissance cellulaire et la synthèse des produits métaboliques. Pour la fermentation IBE, plus de NADPH sera nécessaire, car l'enzyme alcool déshydrogénase secondaire (s-ADH), utilisée pour la transformation de l'acétone en isopropanol, est une enzyme dépendante du NADPH. Selon les études faites par Wang et al, après l'introduction réussie de l'alcool déshydrogénase secondaire dans *C. acetobutylicum* XY1, 4 et 2 mols de NADH sont nécessaires pour la génération de 1 mol de butanol et d'éthanol, respectivement. Pendant ce temps, 1 mol de NADPH est également consommé pour la production de 1 mol d'isopropanol. Le besoin d'une quantité importante du pouvoir réducteur du NADPH, peut générer une perturbation des cofacteurs. Cette perturbation produit une régénération inefficace du NADPH, qui pourrait réduire la croissance cellulaire et la production de solvants.

D'autre part, le NADPH peut être généré à partir du NADP⁺ étant le NADK la seule enzyme capable de catalyser la production du NADP⁺ à partir du NAD⁺. Il a été signalé que le NADK peut être activé par les ions de calcium. C'est pour cela qu'il est nécessaire d'augmenter son niveau intracellulaire par l'ajout du carbonate de calcium dans le milieu de culture, qui aide en même temps l'ajustement du pH (Wang et al., 2018).

Cette série a pour objectif d'observer l'acide butyrique dans des expériences avec contrôle de pH et amélioration de la consommation de glucose. La valeur de 5 g/L de CaCO₃ a été choisie, car cette concentration a été déjà utilisée avec une souche IBE isolée (Zhang et al., 2018). Les expériences faites pour cette série ont utilisé 60 g/L de glucose et comprennent un contrôle sans CaCO₃ (C3) et une fermentation en triplicata avec 5 g/L de CaCO₃ (F14, F15 et F16). Les figures 5.18 à 5.21 montrent les profils de consommation de glucose et la production et les rendements du butanol et isopropanol, tandis que les figures 5.22 à 5.24 montrent les profils du pH et les concentrations des acides organiques (acétique et butyrique).

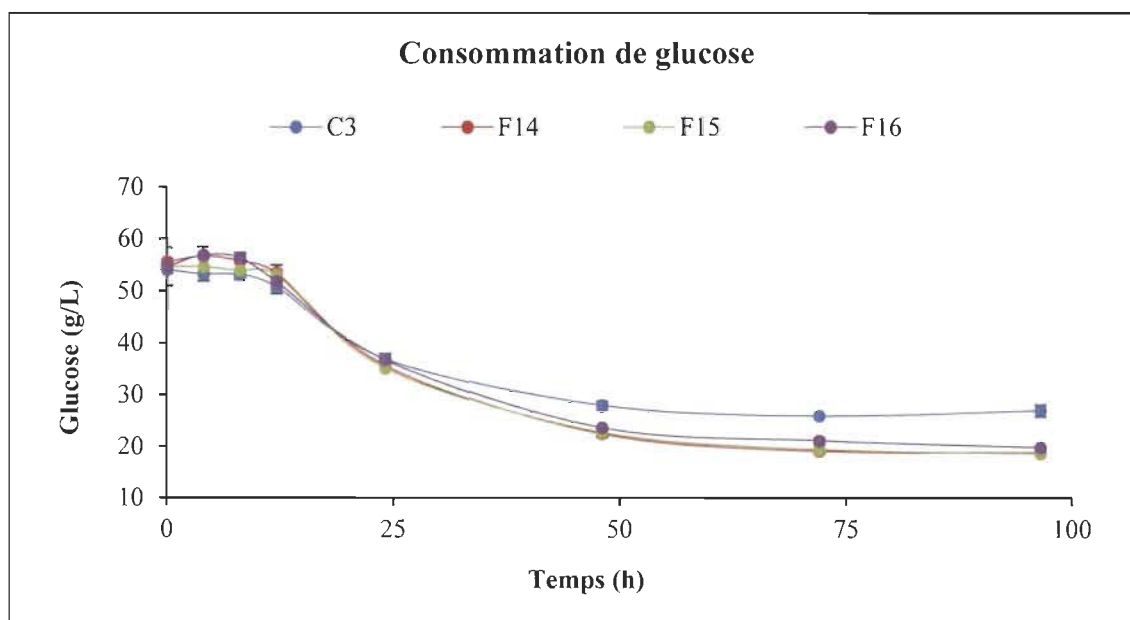


Figure 5.18 Consommation de glucose pour les fermentations avec CaCO₃ (5 g/L)

C3 : Contrôle F14, F15 et F16 : Fermentations avec CaCO₃ (5 g/L)

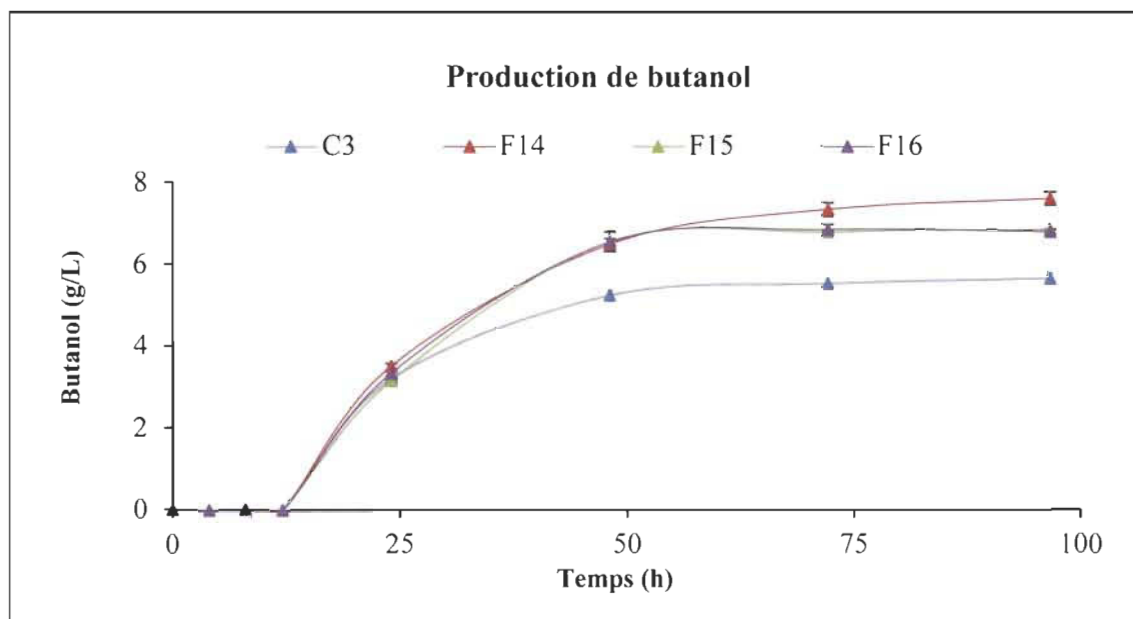


Figure 5.19 Production de butanol pour les fermentations avec CaCO_3 (5 g/L)

C3 : Contrôle F14, F15 et F16 : Fermentations avec CaCO_3 (5 g/L)

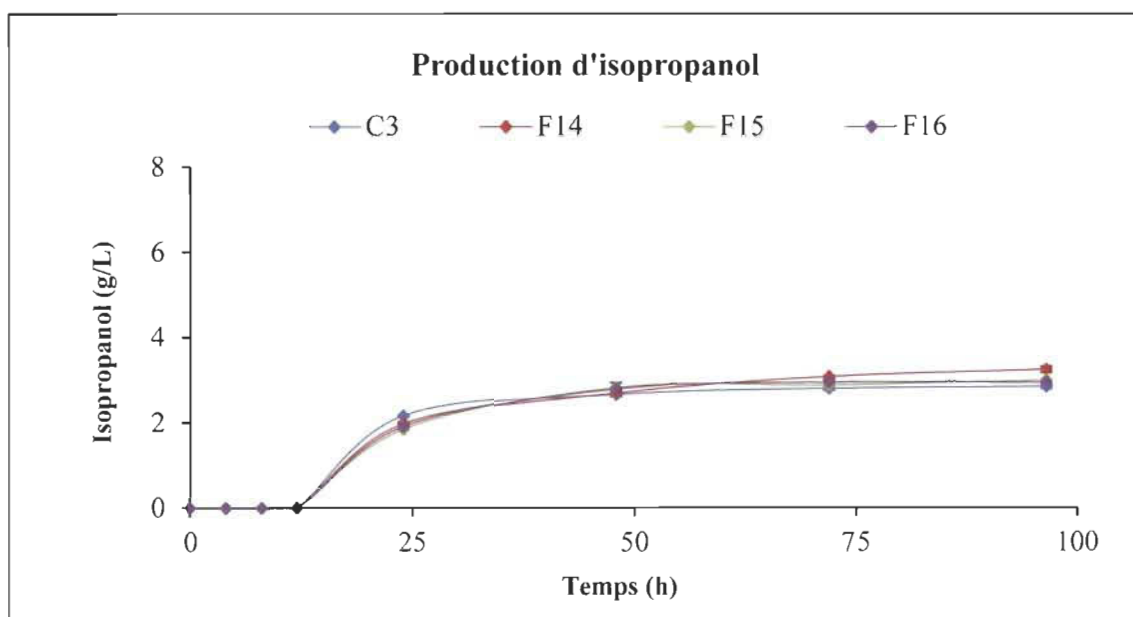


Figure 5.20 Production d'isopropanol pour les fermentations avec CaCO_3 (5 g/L)

C3 : Contrôle F14, F15 ET F16 : Fermentations avec CaCO_3 (5 g/L)

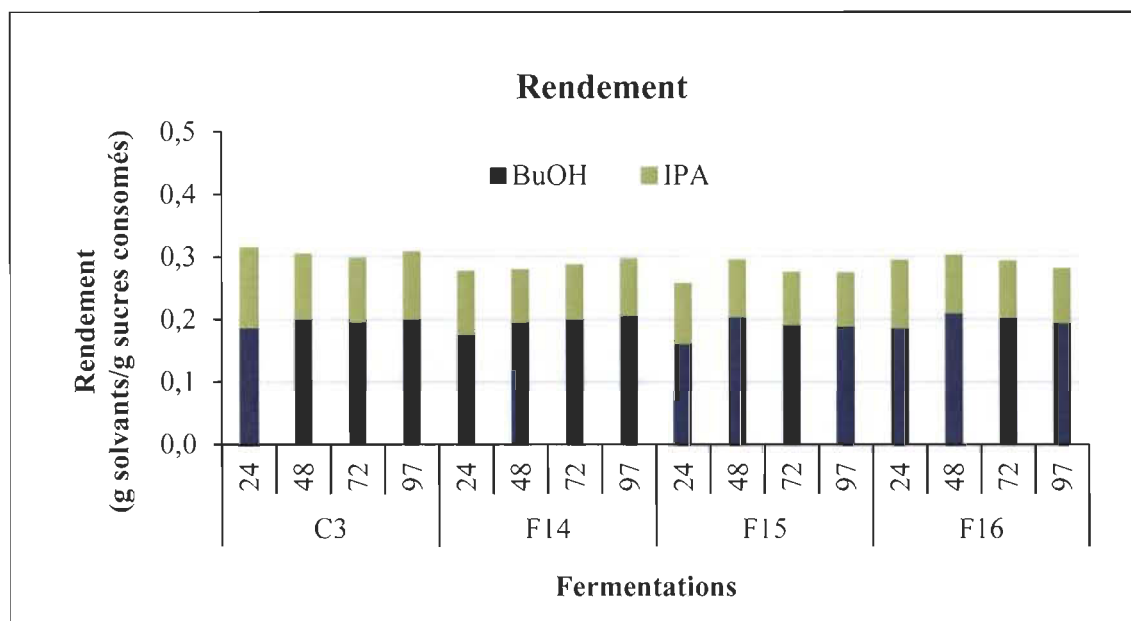


Figure 5.21 . Rendement IB pour les fermentations avec CaCO_3 (5 g/L)

C3 : Contrôle F14, F15 ET F16 : Fermentations avec CaCO_3 (5 g/L)

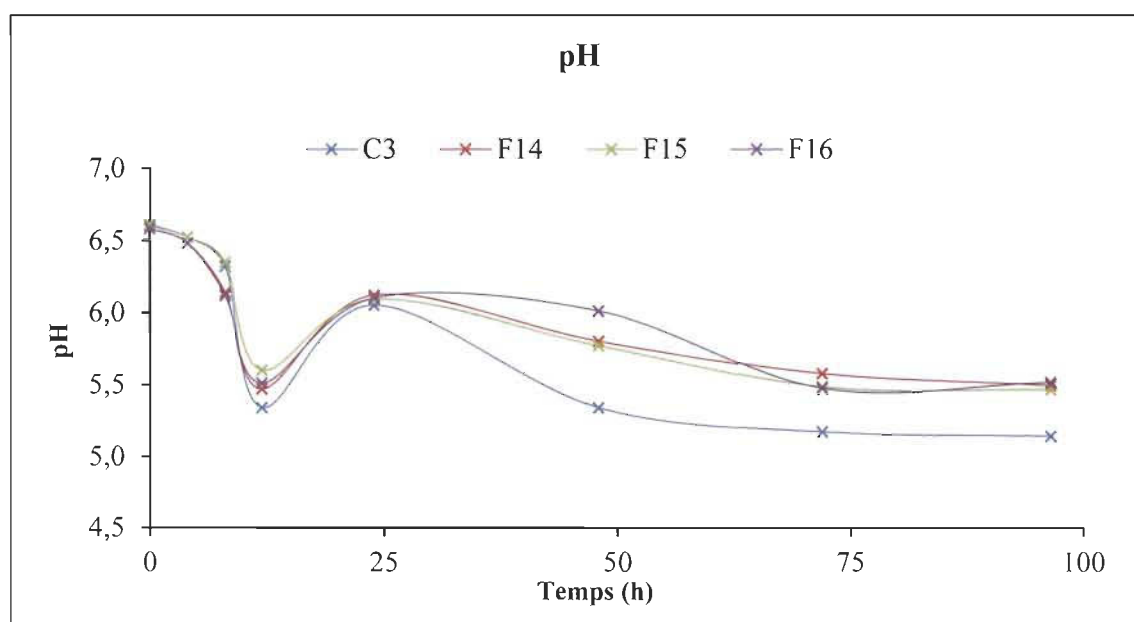


Figure 5.22 Variation du pH pour les fermentations avec CaCO_3 (5 g/L)

C3 : Contrôle F14, F15 ET F16 : Fermentations avec CaCO_3 (5 g/L)

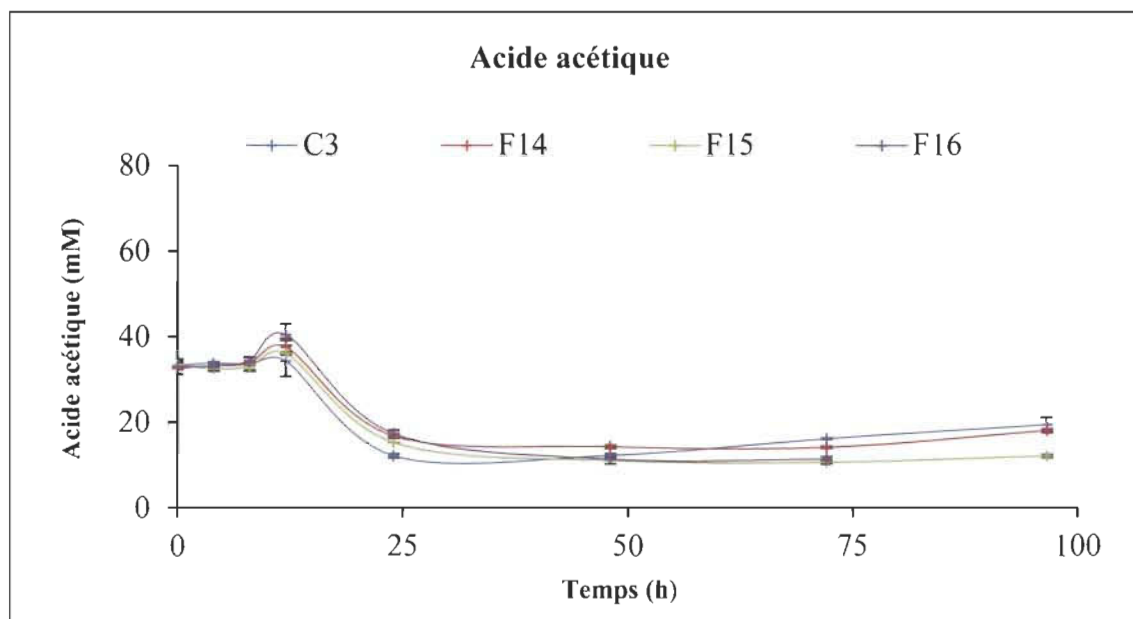


Figure 5.23 Concentration d'acide acétique pour les fermentations avec CaCO_3 (5 g/L)

C3 : Contrôle F14, F15 et F16 : Fermentations avec CaCO_3 (5 g/L)

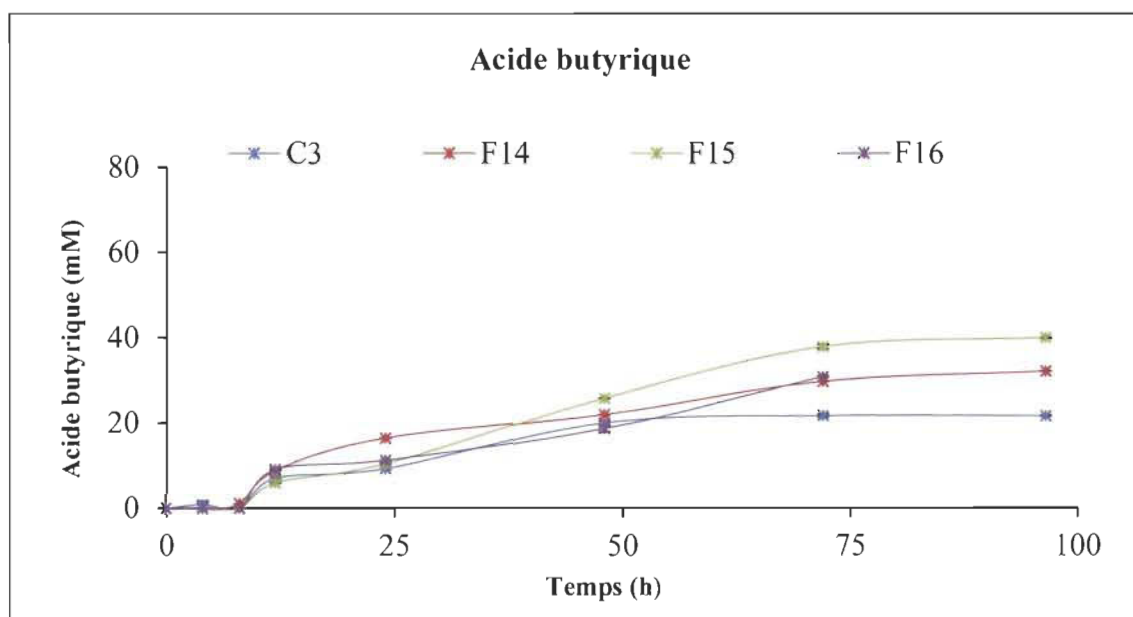


Figure 5.24 Concentration d'acide butyrique pour les fermentations avec CaCO_3 (5 g/L)

C3 : Contrôle F14, F15 et F16 : Fermentations avec CaCO_3 (5 g/L)

Pour connaître la valeur la plus basse du pH pendant la phase acidogène, les prélèvements à 8 h et 12 h ont été ajoutés. Ces derniers ont permis de différencier une phase acidogène plus prononcée et d'émettre l'hypothèse que la valeur du pH peut atteindre de valeurs proches de 5 avant de commencer la production de solvants, après 12 h. Une nouvelle diminution du pH a été observée dans toutes les fermentations à partir de 48 h et a continué jusqu'à la fin.

Cette diminution du pH a été observée dans toutes les fermentations faites jusqu'à présent et cela est probablement lié à la formation des acides organiques. La concentration de ces acides a atteint possiblement des niveaux inhibiteurs qu'empêchent la bactérie de les transformer en solvants.

L'ajout de CaCO_3 a aidé à maintenir un pH entre 5,47 et 6,12 pendant la phase solvantogène. Par contre, pour C3, cette chute de pH a été plus prononcée, jusqu'à de valeurs proches de 5. Le CaCO_3 a aidé aussi à consommer plus de glucose (66 %) en comparaison aux expériences avec une concentration de 60 g/L : F5 et F6 (54 % et 58%) et le contrôle C3 (50 %). Néanmoins, le but de consommer complètement le glucose n'a pas été possible. Le rendement en butanol a été similaire pour les quatre fermentations, avec la valeur la plus élevée à 48 h. Par contre, il n'y pas eu une amélioration en comparaison avec les autres expériences. Il ne semble pas non plus que l'ajout de CaCO_3 puisse aider à produire plus d'isopropanol.

La production d'acide butyrique a continué après 48 h pour les fermentations avec CaCO_3 , mais jusqu'à des concentrations possiblement inhibitrices pour les transformer en butanol. Le cas contraire s'applique au contrôle, car la production de l'acide butyrique a arrêté après 48 h. L'ajout de CaCO_3 a permis de maintenir un pH entre 5,47 et 6,12 malgré une concentration en acides supérieure à celle du contrôle, tandis que le pH de C3 a baissé jusqu'à presque 5. Le tableau 5.5 compile les résultats des fermentations à 48 h.

Tableau 5.5 Résultats des fermentations avec CaCO_3 (5 g/L) à 48 h

Fermentations	C3	F14	F15	F16
Glucose (g/L)	53,95 ± 0,68	55,41 ± 0,72	54,60 ± 3,63	54,55 ± 0,80
Consommation glucose	49%	60%	59%	57%
BuOH (g/L)	5,27 ± 0,16	6,51 ± 0,13	6,57 ± 0,24	6,56 ± 0,08
IPA (g/L)	2,68 ± 0,04	2,71 ± 0,04	2,85 ± 0,11	2,81 ± 0,01
Acide acétique (mM)	12,45 ± 0,41	14,41 ± 0,38	11,24 ± 0,74	11,62 ± 0,41
Acide butyrique (mM)	20,11 ± 0,46	22,02 ± 0,11	25,81 ± 0,05	18,78 ± 0,71
Rendement BuOH (g/g)^a	0,201 ± 0,005	0,196 ± 0,003	0,205 ± 0,011	0,211 ± 0,001
Rendement IPA (g/g)^b	0,102 ± 0,002	0,082 ± 0,003	0,089 ± 0,005	0,090 ± 0,001
Rendement IB (g/g)^c	0,303 ± 0,007	0,278 ± 0,007	0,294 ± 0,016	0,301 ± 0,002

a. g BuOH/g de glucose consommé, b. g IPA/g de glucose consommé, c. (g BuOH + g IPA)/g de glucose consommé

5.1.5 Fermentations avec contrôle du pH à 5,5

Le contrôle et suivi du pH est un paramètre crucial pour les fermentations, car il affecte les concentrations des acides organiques non dissociés (Richter et al., 2012). Avec l'ajout du CaCO_3 , qui a permis de contrôler un peu le pH, il a été possible de produire plus d'acide butyrique et consommer plus de glucose. Un témoin sans contrôle de pH (C4) et deux fermentations (F17 et F18) dont le pH a été maintenu à 5,5 avec NaOH 2N ou H_2SO_4 2N ont été réalisées. Les figures 5.25 à 5.28 montrent les profils de consommation de glucose, la production et le rendement en butanol et isopropanol.

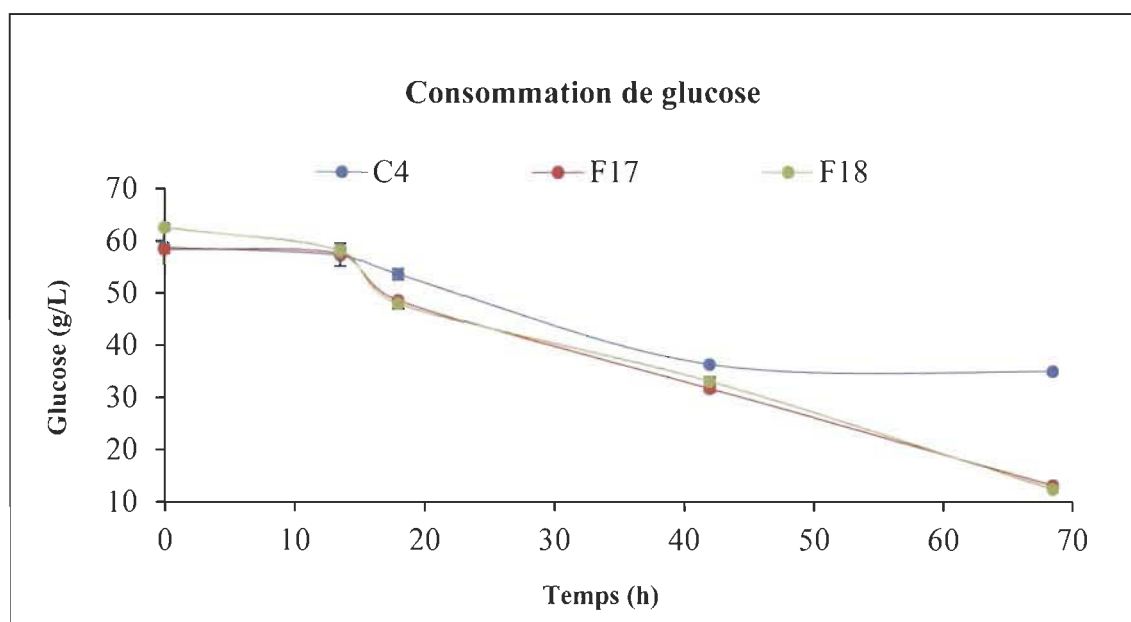


Figure 5.26 Consommation de glucose pour les fermentations avec pH contrôlé

C4 : Témoin F17 et F18 : Fermentations avec pH contrôlé

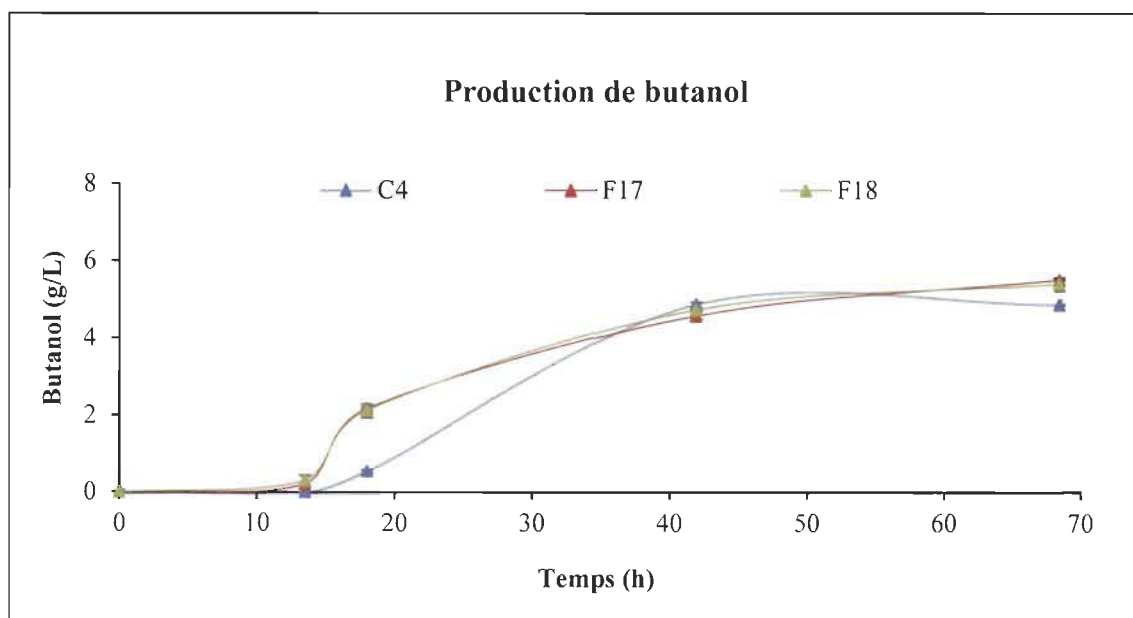


Figure 5.25 Production de butanol pour les fermentations avec pH contrôlé

C4 : Témoin F17 et F18 : Fermentations avec pH contrôlé

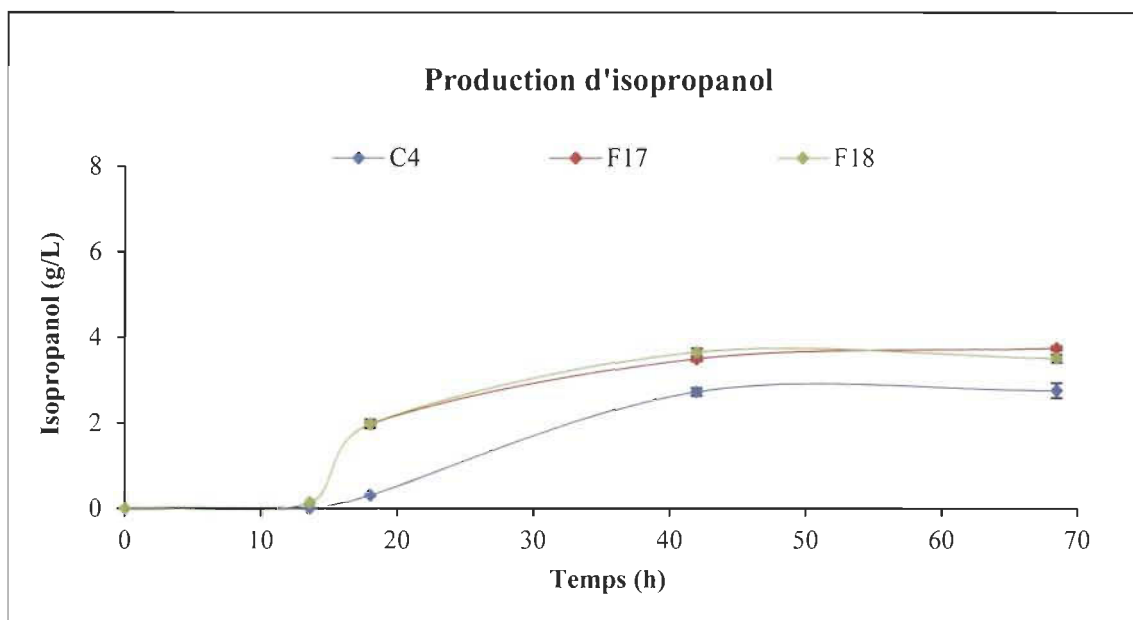


Figure 5.27 Production d'isopropanol pour les fermentations avec pH contrôlé

C4 : Témoin F17 et F18 : Fermentations avec pH contrôlé

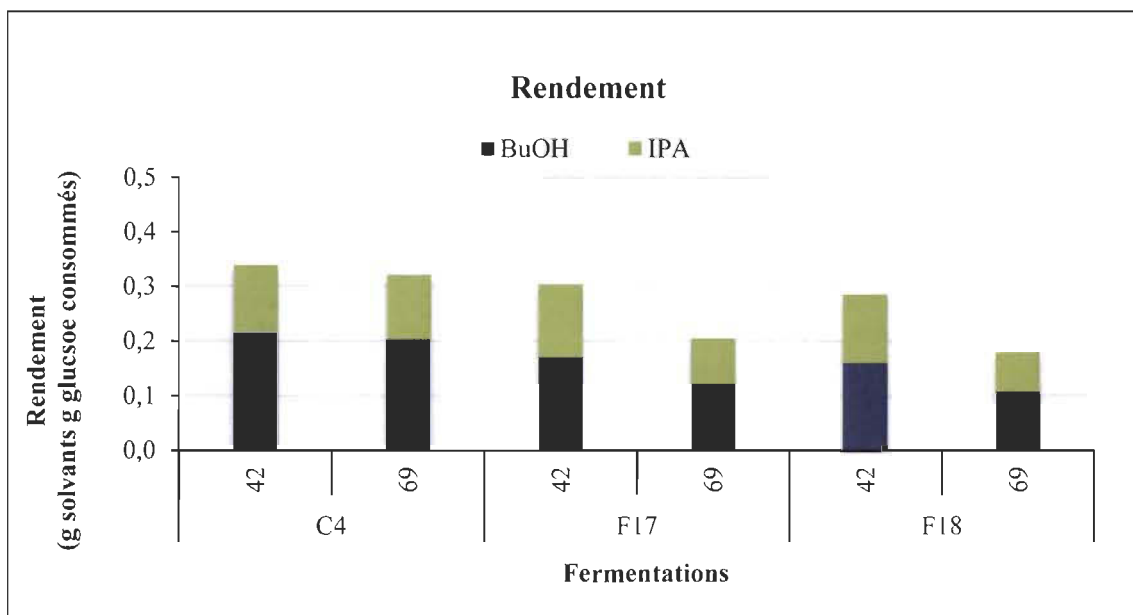


Figure 5.28 Rendement IB pour les fermentations avec pH contrôlé

C4 : Témoin F17 et F18 : Fermentations avec pH contrôlé

Les figures 5.29 à 5.31 présentent les profils du pH et les concentrations d'acide acétique et d'acide butyrique pendant les fermentations. Ce profil a permis d'identifier le moment de transition de la phase acidogène vers la phase solvantogène. Ce changement s'est produit vers 13,5 h, quand la valeur minimale de pH était de 5,12 pour la fermentation F17 et 5,09 pour la fermentation F18. Le contrôle du pH a commencé une heure et demie (1,5 h) après le début de la phase de production de solvants, lorsque le pH a atteint une valeur de 5,5.

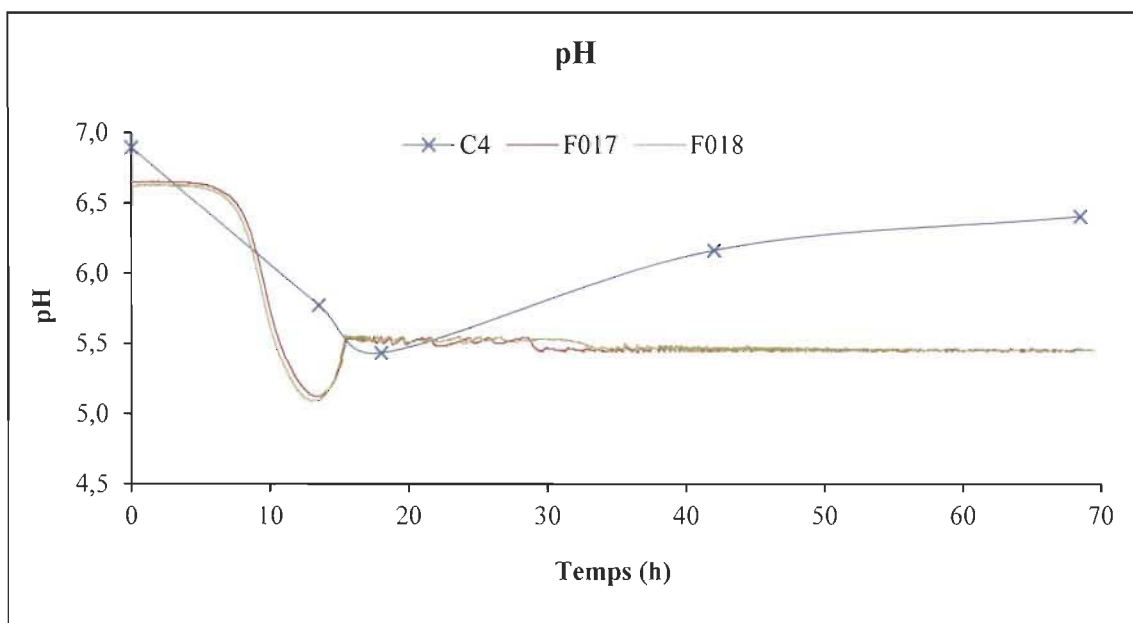


Figure 5.29 Variation du pH pour les fermentations avec pH contrôlé

C4 : Témoin F17 et F18 : Fermentations avec pH contrôlé

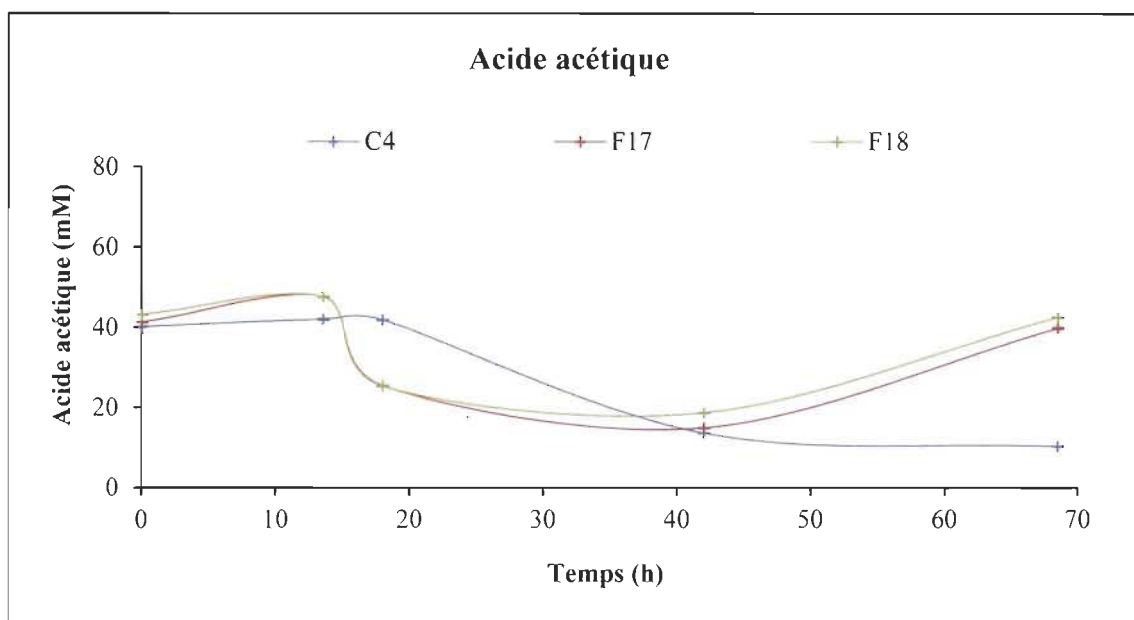


Figure 5.30 Concentration d'acide acétique pour les fermentations avec pH contrôlé

C4 : Témoin F17 et F18 : Fermentations avec pH contrôlé

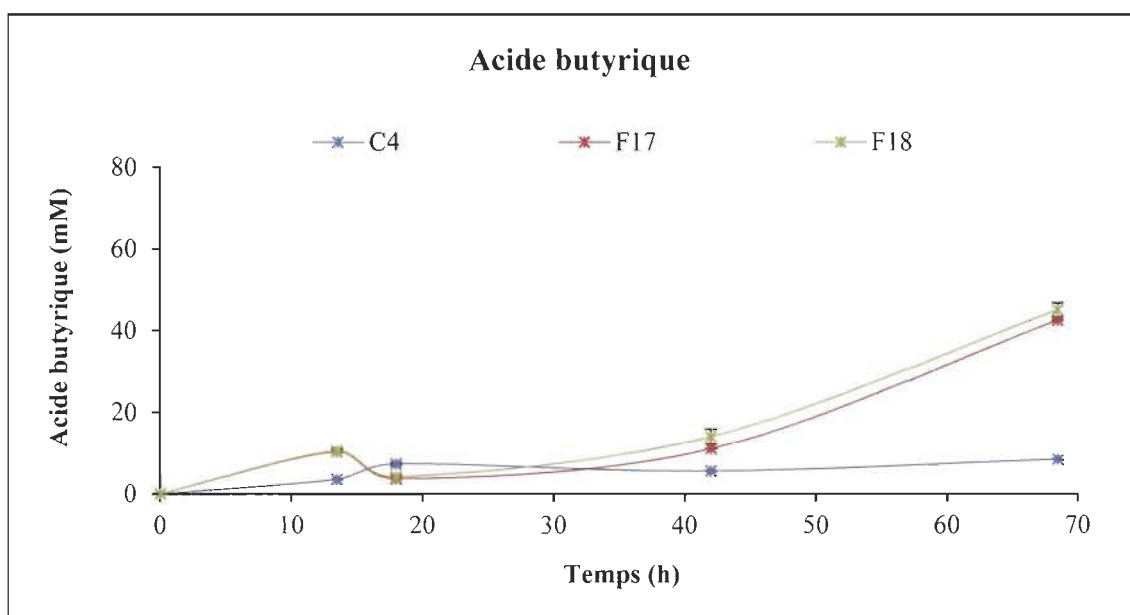


Figure 5.31 Concentration d'acide butyrique pour les fermentations avec pH contrôlé

C4 : Témoin F17 et F18 : Fermentations avec pH contrôlé

Il a également été observé que le contrôle du pH a aidé à avoir une production, en continu, de l'acide acétique et de l'acide butyrique en comparaison au témoin. Cependant, cette production d'acides n'a pas généré plus de butanol, probablement parce que les concentrations ont atteint des niveaux toxiques pour le micro-organisme.

Pour la première fois, les acides organiques non dissociés ont été calculés (voir annexe A.2), afin de trouver la concentration qui a permis le passage vers la production de solvants. Les figures 5.32 et 5.33 montrent le profil des concentrations des acides non dissociés pendant les fermentations, tandis que le tableau 5.6 présente les concentrations au moment du changement vers la phase solvantogène.

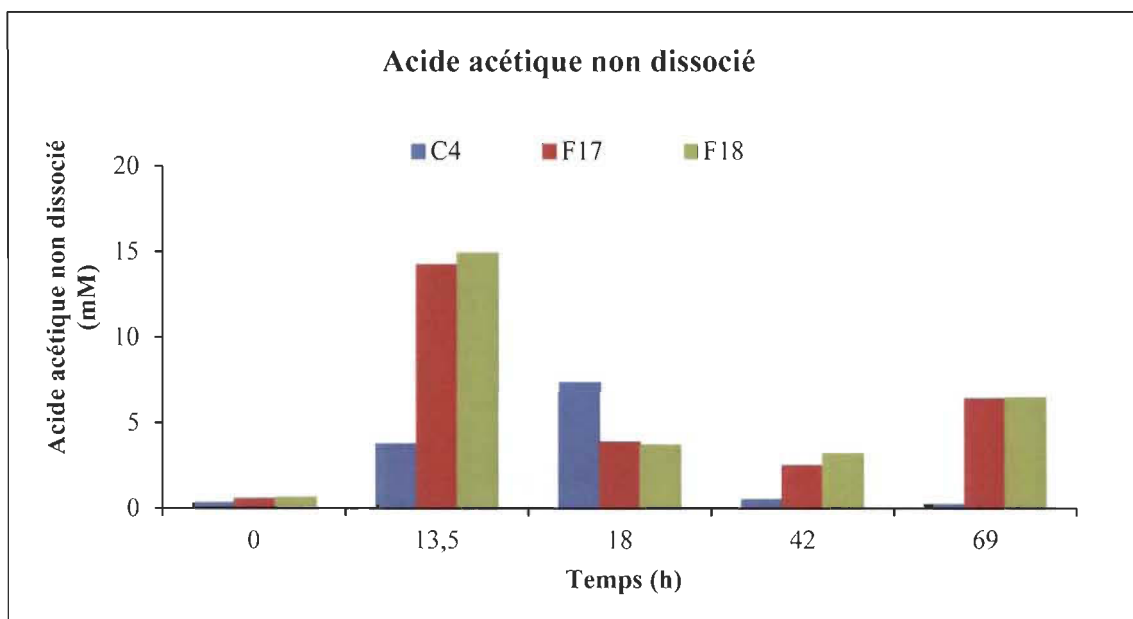


Figure 5.32 Concentration d'acide acétique non dissocié pour les fermentations avec pH contrôlé

C4 : Témoin F17 et F18 : Fermentations avec pH contrôlé

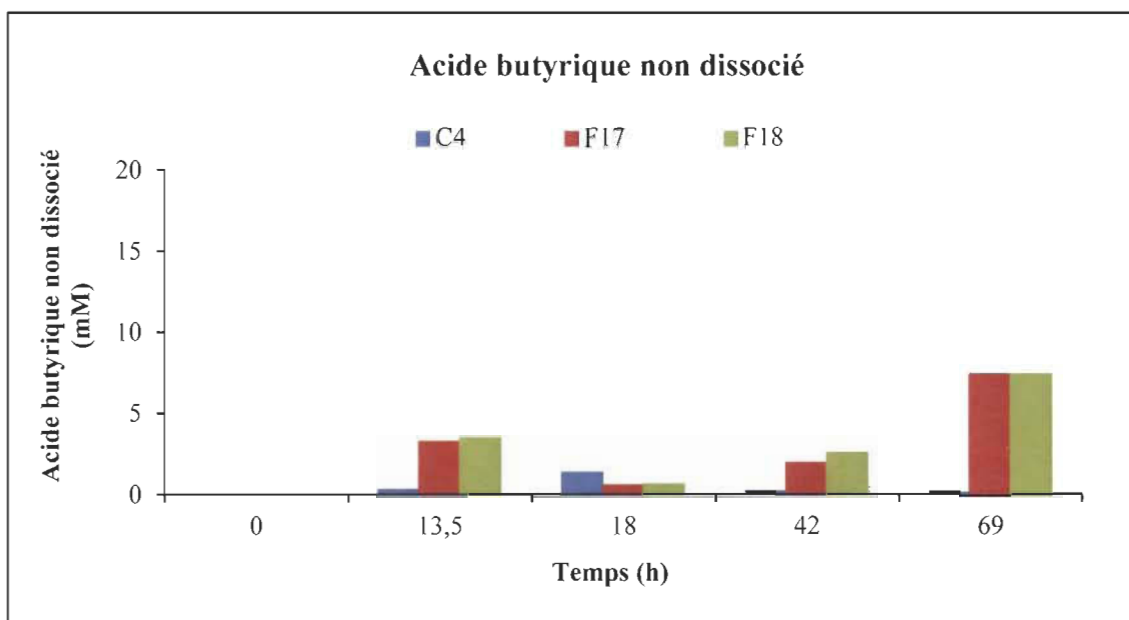


Figure 5.33 Concentration d'acide butyrique non dissocié pour les fermentations avec pH contrôlé

C4 : Témoin F17 et F18 : Fermentations avec pH contrôlé

Tableau 5.6 Concentration des acides organiques non dissociés au moment du changement vers la phase solvantogène (13,5 h)

Fermentation	C4	F17	F18
Acide acétique non dissocié (mM)	3,74	14,21	14,89
Acide butyrique non dissocié (mM)	0,39	3,28	3,51

Selon les résultats, il a été nécessaire d'avoir 3,40 mM d'acide butyrique non dissocié pour commencer à produire de butanol, mais au cours des fermentations, la concentration d'acide butyrique n'a pas été adéquate pour continuer à se transformer en butanol. Selon Richter et al : « Il est nécessaire de trouver une concentration d'acide butyrique non dissociée adaptée à la souche et aux conditions bactériennes spécifiques : suffisamment élevée, pour déclencher la phase solvantogène, mais en même temps, avec une concentration la plus faible possible pour minimiser l'impact négatif dans le métabolisme et la viabilité cellulaire » (Richter et al., 2012).

Finalement, le contrôle du pH à 5,5 a amélioré la consommation de glucose, étant donné que la consommation a été de 77 % et 80 % pour F17 et F18, en comparaison avec le contrôle C4 (41 %). Bien qu'il y ait eu une consommation majeure de glucose, le rendement en butanol s'est détérioré. Le contrôle C4 a donné 0,205 g BuOH/g glucose consommé tandis que F17 et F18 ont généré 0,121 g BuOH/g et 0,107 g BuOH/g glucose consommé, respectivement. Le tableau 5.7 présente les résultats des fermentations.

Tableau 5.7 Résultats finaux des fermentations avec contrôle de pH

Fermentations	C4	F17	F18
Glucose (g/L)	58,80 ± 0,25	58,46 ± 0,73	62,56 ± 0,58
Consommation glucose	41%	77%	80%
BuOH (g/L)	4,85 ± 0,13	5,48 ± 0,01	5,38 ± 0,17
IPA (g/L)	2,78 ± 0,17	3,75 ± 0,05	3,51 ± 0,09
Acide acétique (mM)	10,32 ± 0,01	39,72 ± 0,14	42,46 ± 0,03
Acide butyrique (mM)	8,24 ± 0,04	42,39 ± 0,14	44,90 ± 1,74
Rendement BuOH (g/g) ^a	0,203 ± 0,008	0,121 ± 0,070	0,107 ± 0,004
Rendement IPA (g/g) ^b	0,116 ± 0,008	0,083 ± 0,048	0,070 ± 0,002
Rendement IB (g/g) ^c	0,320 ± 0,016	0,204 ± 0,117	0,178 ± 0,006

a. g BuOH/g de glucose consommé, b. g IPA/g de glucose consommé, c. (g BuOH + g IPA)/g de glucose consommé

5.1.6 Fermentations avec un mélange de sucres

Comme il a déjà été signalé, le CÉPROCQ a développé une expertise avec la fermentation ABE à partir de bois de bouleau jaune (Benali et al., 2019). Ceci a amené à explorer le comportement de la souche *C. beijerinckii* DSM 6423 avec un mélange de sucres similaire à la composition des sucres du bois de bouleau jaune. Cette série a été réalisée en triplicata (F19, F20 et F21).

En raison de la consommation incomplète de glucose dans les expériences avec une concentration initiale de 60 g/L (F5 à F18) et pour éviter une concentration en sucres totaux supérieure à 60 g/L au début de la fermentation, la concentration en glucose a été changée à 40 g/L.

Pour mieux comprendre la consommation du mélange de sucres, le glucose et le groupe de sucres composé par xylose, mannose et galactose (XMG) ont été observés séparément. La consommation d'arabinose n'a pas été prise en considération, car le pourcentage était très faible par rapport aux autres sucres.

Les profils obtenus montrent que la bactérie a eu une préférence pour le glucose, puisque sa consommation dans les fermentations F19, F20 et F21 a été de 69 %, 77 % et 80 % par rapport au groupe XMG, dont la consommation a été de 51 %, 52 % et 54 %, respectivement. Ce phénomène, appelé « *répression catabolique* » a déjà été décrit par Mitchel (Mitchell, 1997), vu que la présence de glucose inhibe l'assimilation d'autres sucres.

En même temps, la consommation de glucose du mélange a été inférieure à la consommation des expériences F3 et F4 avec du glucose à 40 g/L (97 % et 87 %).

Bien que le but des fermentations a été d'obtenir de résultats intéressants idéalement en 72 h, après ce temps, nous avons observé la formation de la mousse dans le milieu, un indicateur qui est normalement lié à la croissance. Cela pourrait s'interpréter comme une croissance diauxique ou croissance dans deux phases, un phénomène qui permet aux microorganismes de s'adapter à l'ajout d'un second substrat, dans ce cas, les sucres différents du glucose. Il se caractérise d'abord, par une phase de croissance suivie d'une phase de latence, après quoi, la croissance reprend (Buendia-Kandia et al., 2018).

Par rapport au rendement IB, il n'y a pas eu une amélioration en comparaison avec les autres expériences.

Il est important de souligner qu'il existe très peu d'études qui parlent des fermentations IBE avec un mélange synthétique de sucres pour simuler la composition des sucres

d'origine lignocellulosique. Ce serait donc l'une des rares tentatives existantes pour analyser le comportement de la bactérie dans ce type d'environnement.

La figure 5.34 à 5.37 et le tableau 5.8 regroupent les résultats à la fin de la fermentation.

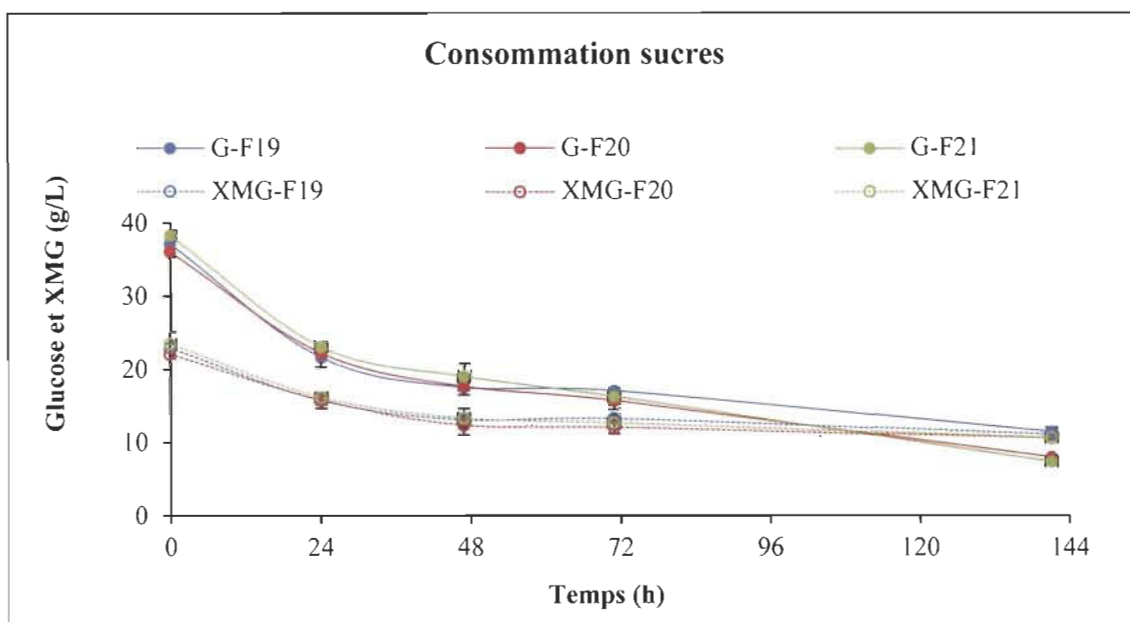


Figure 5.34 Consommation de sucres pour les fermentations F19, F20 et F21

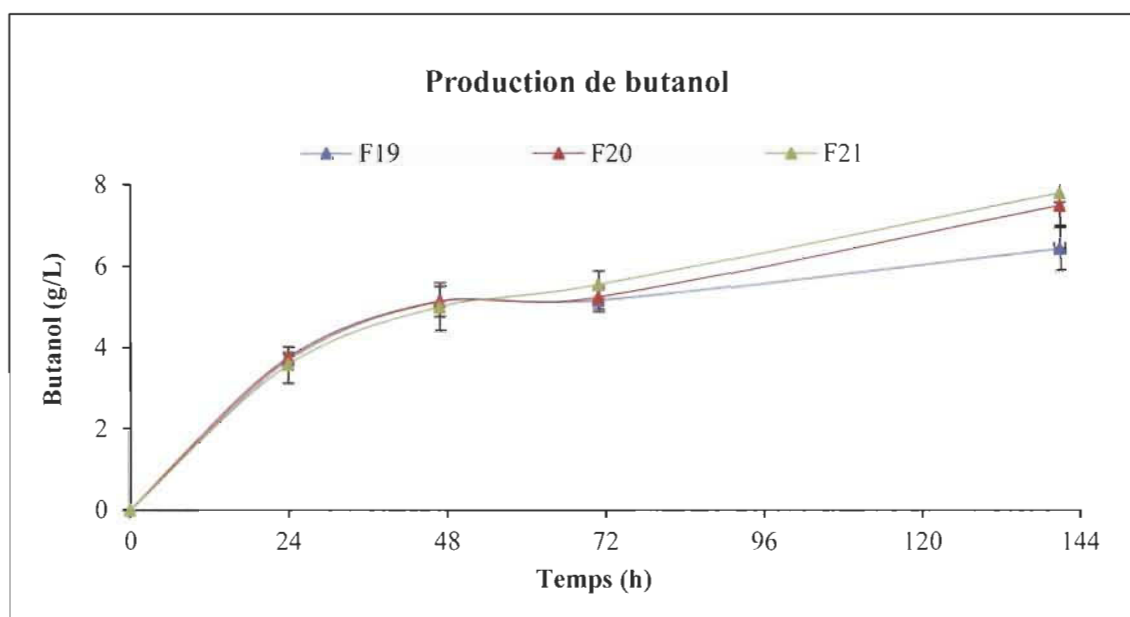


Figure 5.35 Production de butanol pour les fermentations avec un mélange de sucres

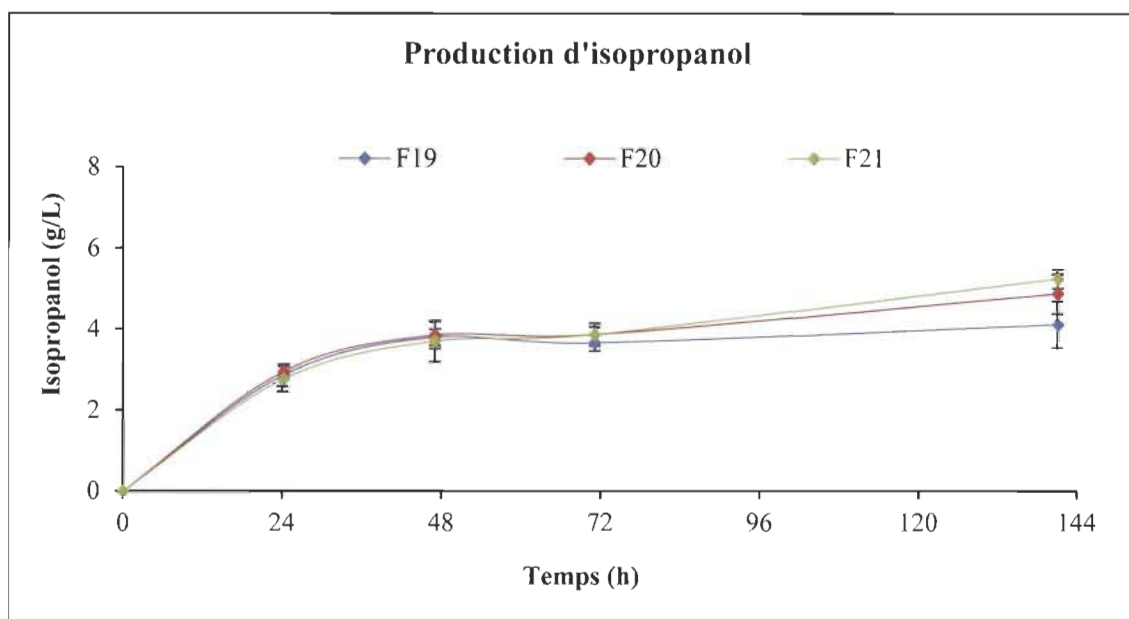


Figure 5.36 Production d'isopropanol pour les fermentations avec un mélange de sucres

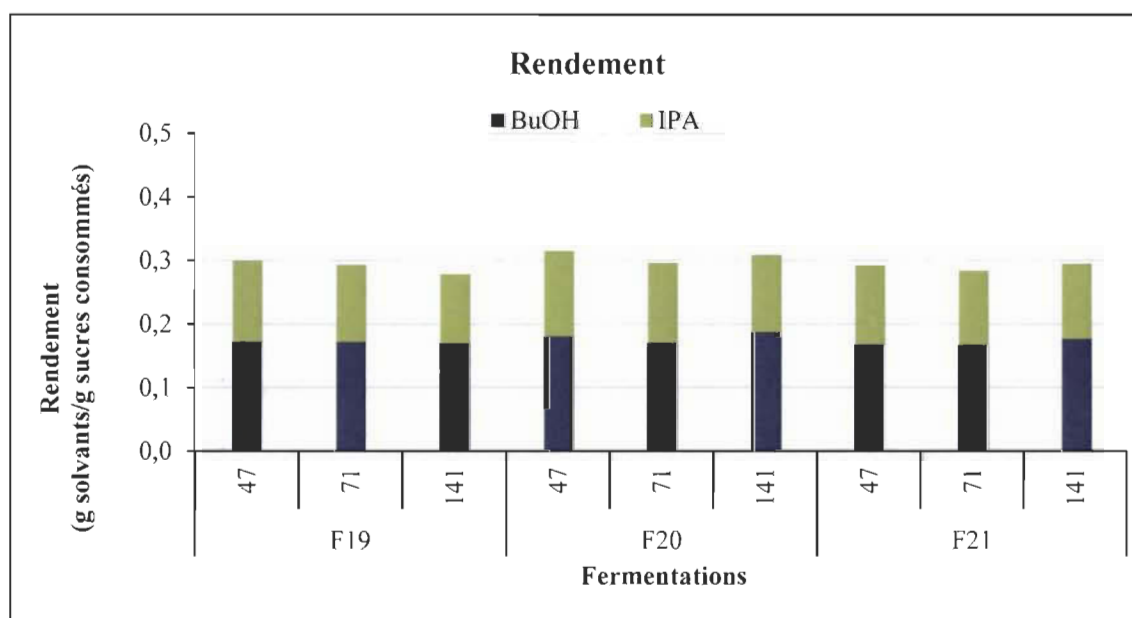


Figure 5.37 Rendement IB pour les fermentations avec un mélange de sucres

Tableau 5.8 Résultats des fermentations avec un mélange de sucres

Fermentation	F19	F20	F21
Glucose initial (g/L)	37,17 ± 1,84	36,08 ± 0,53	38,28 ± 2,38
Glucose final (g/L)	11,59 ± 0,60	8,19 ± 0,20	7,56 ± 0,14
XMG initial (g/L)	23,03 ± 0,95	22,21 ± 0,61	23,58 ± 1,60
XMG Final (g/L)	11,25 ± 0,68	10,75 ± 0,26	10,80 ± 0,29
Consommation glucose (%)	69%	77%	80%
Consommation XMG (%)	51%	52%	54%
BuOH (g/L)	6,46 ± 0,86	7,49 ± 0,54	7,80 ± 0,23
IPA (g/L)	4,11 ± 0,58	4,86 ± 0,48	5,23 ± 0,23
Rendement BuOH (g/g) ^a	0,170 ± 0,006	0,187 ± 0,005	0,177 ± 0,006
Rendement IPA (g/g) ^b	0,108 ± 0,005	0,122 ± 0,006	0,118 ± 0,004
Rendement IB (g/g) ^c	0,278 ± 0,011	0,309 ± 0,011	0,295 ± 0,009

a. g BuOH/g de glucose consommé, b. g IPA/g de glucose consommé, c. (g BuOH + g IPA)/g de glucose consommé

5.1.7 Fermentations avec l'hydrolysate à partir de la tige de maïs

Cette série a été faite en duplicata (TM1 et TM2), sans contrôle. Le tableau 5.9 présente la composition en sucres de l'hydrolysate obtenu à partir de la tige de maïs prétraitée, après 87 heures d'hydrolyse.

Tableau 5.9 Concentration de sucres dans l'hydrolysate

Sucres	Concentration (g/L)
Glucose (g/L)	84,85 ± 5,97
Xylose, Mannose, galactose (g/L)	42,40 ± 1,68
Arabinose (g/L)	3,57 ± 0,21

Bien que l'hydrolysate ait été centrifugé plusieurs fois, la présence de particules en suspension très fines a été observée et difficiles à enlever. On note aussi une coloration

brune foncée, ce qui a rendu difficile la lecture de la densité optique pour mesurer la croissance (voir figure 5.38).

Une fois que l'hydrolysât ait été ajouté dans le milieu, les concentrations initiales des sucres étaient d'environ 40 g/L de glucose, 20 g/L de XMG et 1,6 g/L d'arabinose.



Figure 5.38. Fermentations avec l'hydrolysât de la tige de maïs prétraitée

Avec l'ajout de l'hydrolysât dans le milieu de culture, un comportement différent de toutes les expériences précédentes était attendu. Dans le cas de la croissance et avec la difficulté de suivre la densité optique, de petits incréments ont été mesurés à partir de 48 h. Cela signifie que la phase de latence a été beaucoup plus longue en raison des conditions défavorables pour leur développement, puisque normalement à 72 h, la bactérie se trouve déjà dans la phase stationnaire de croissance et la production de butanol cesse. Malgré ce temps de latence si long, il a été décidé de poursuivre l'expérience dans le but de savoir si, à un moment donné, il était possible d'obtenir le butanol.

Ce temps de latence si long est probablement dû à la présence, dans l'hydrolysât, des composés phénoliques en concentrations pas totalement inhibitrices, vu que l'hydroxyméthylfurfural et le furfural n'ont pas été détectés. Donc, une détoxification pourrait aider à accélérer la production de butanol.

Ces différences de croissance se reflètent évidemment dans la consommation de sucres et dans la production de solvants, vu que la fermentation TM1 a été la première à consommer

les sucres et la première à produire les solvants. Cependant, le pourcentage de consommation des sucres à 144 h était le même (66 %) pour les deux fermentations (TM1 et TM2).

En observant séparément le pourcentage de consommation du glucose par rapport à celui de sucres XGM, il a été noté une plus grande consommation du premier, comportement déjà observé dans les fermentations avec le mélange de sucres synthétiques.

Le Tableau 5.10 présente les résultats des fermentations avec l'hydrolysats.

Tableau 5.10 Résultats des fermentations avec l'hydrolysats de la tige de maïs prétraitée

Fermentation	TM1	TM2
Glucose initial (g/L)	37,94 ± 1,12	38,47±0,71
XMG (g/L)	20,18 ± 0,67	20,57 ± 0,34
Consommation glucose (%)	74%	76%
Consommation XMG (%)	57%	58%
Consommation sucres (%)	66%	66%
BuOH (g/L)	5,84 ± 0,09	6,89±0,32
IPA (g/L)	4,66 ±0,02	5,27±0,14
Rendement BuOH (g/g)	0,138 ±0,001	0,153±0,005
Rendement IPA (g/g)	0,108 ± 0,001	0,117±0,002
Rendement IB (g/g)	0,246 ± 0,002	0,270±0,007

Chapitre 6 - Discussion

6.1 Concentration initiale de glucose

Afin de comparer le rendement en butanol en fonction de la concentration initiale en glucose, trois concentrations ont été étudiées: 20 g/L, 40 g/L et 60 g/L. Cependant, un intérêt particulier s'est porté sur la concentration de 60 g/L, car c'est la concentration la plus étudiée dans les fermentations ABE en discontinu.

Au fur et à mesure que la concentration initiale de glucose a augmentée, deux situations ont été observées: plus la concentration initiale de glucose était élevée, plus la consommation de glucose était faible, mais en même temps, le rendement en butanol était supérieur. Probablement une concentration de 20 g/L ne permet pas d'obtenir la concentration d'acides nécessaire pour continuer la production de solvants et, dans le cas de fermentations avec une consommation incomplète de glucose, la production d'acides a dépassé la valeur critique qui permet aux bactéries, en même temps, de consommer du glucose, le convertir en acides et le transformer en solvants. Le contrôle du pH peut être une stratégie qui peut faciliter la consommation de glucose, mais des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre ce métabolisme, étant donné que, selon la littérature, pendant une fermentation IBE, la bactérie est inhibée lorsqu'il y a une concentration de 7 g/L de butanol (dos Santos Vieira et al., 2019).

Bien que les fermentations effectuées dans ce travail aient été réalisées pendant 144 heures, les résultats obtenus à 48 h ont été comparés à ceux de la littérature avec une concentration de 60 g/L. Les valeurs obtenues par rapport à la concentration de butanol étaient similaires, mais avec un rendement supérieur, vu que moins de glucose a été consommé. Le tableau 6.1 présente les résultats trouvés dans la littérature et de ce travail.

Tableau 6.1 Comparaison de résultats des fermentations IBE avec *Clostridium beijerinckii* DSM 6423

Sucres	Conc. initiale de sucres (g/L)	Consom sucres (%)	Temps de fermen.	Acétone (g/L)	IPA (g/L)	EtOH (g/L)	BuOH (g/L)	Rend. BuOH	Réf.
Glucose	61 ± 4	52 ± 4	47 h	0,2 ± 0,0	2,9 ± 0,4	0,2 ± 0,0	4,0 ± 1,0	0,12 ± 0,03	(Rochón et al., 2015)
Glucose	56 ± 1	53,0 ± 0,1	47 h	0,2 ± 0,0	3,8 ± 0,1	0,2 ± 0,0	4,3 ± 0,2	0,14 ± 0,01	
Glucose	60	33,8	48 h	< 0,1	2,16	< 0,1	3,71	0,187	(Survase et al., 2011)
Glucose	56,77 ± 0,65	35,83	48 h	ND	2,23 ± 0,02	ND	4,00 ± 0,09	0,196 ± 0,03	Ce travail
Glucose	55,93 ± 1,81	35,03	48 h	ND	2,31 ± 0,26	ND	3,96 ± 0,32	0,202 ± 0,02	

Rend. BuOH : g BuOH/g glucose consommé

ND : No détecté

6.2 Contrôle de pH

Afin d'améliorer la consommation de glucose, parmi les stratégies étudiées figure le contrôle du pH. Malgré le fait qu'il n'y ait pas beaucoup d'informations à ce sujet pour les fermentations IBE, un exercice intéressant serait d'essayer d'appliquer les connaissances acquises du contrôle du pH des fermentations ABE aux fermentations IBE.

La formation d'acides et leur réassimilation dépendent directement du pH du milieu. De plus, une accumulation d'acides jusqu'à une certaine concentration, qui est difficile à détecter, est essentielle pour la production de solvants. Pour cette raison, il est important de contrôler correctement le pH après la phase acidogène, mais très peu de recherches ont été réalisées pour comprendre le moment à partir duquel le contrôle doit commencer. En ce qui concerne le pH, il est aussi important de tenir compte les formes non dissociées des acides butyrique et acétique, vu que sont celles qui peuvent pénétrer librement à travers la membrane cytoplasmique et diminuer le pH interne. Cette accumulation d'acides affecte négativement le fonctionnement de la cellule, ainsi qu'une différence de pH constante entre l'intérieur et l'extérieur de la membrane cytoplasmique est moins néfaste pour la cellule et peut être obtenue en contrôlant le pH externe (Jiang et al., 2014).

Comme il a été expliqué précédemment, parmi les tentatives faites pour comprendre l'impact du pH sur la consommation de glucose, des expériences ont été réalisées avec un

pH initial de 5, l'utilisation d'un tampon acétate 50 mM à pH 5, l'utilisation de CaCO_3 et le contrôle du pH externe.

Même si dans la deuxième série des fermentations, il n'ait pas été possible d'augmenter la consommation de glucose, il est intéressant de faire un premier essai pour comprendre l'impact des acides non dissociés. Malgré le fait que les acides organiques n'aient pas été mesurés pour le contrôle (C1), ni pour les fermentations avec un pH initial de 5 (F7 et F8) ou avec un tampon acétate 0,50 mM (F9 et F10), il est possible d'illustrer l'effet du pH sur eux au début de la fermentation, en raison de la composition du milieu de culture TYA (voir annexe A.2). Ce milieu a en moyenne 45 mM d'acide acétique pour C1, F7 et F8 et 95 mM pour F9 et F10. Le tableau 6.2 montre la concentration de l'acide acétique non dissocié au début de la fermentation pour cette série.

Tableau 6.2 Estimation de la concentration d'acide acétique non dissocié au début de la fermentation

Fermentation	Acide acétique	pH initial	Acide acétique non dissocié
C1	45 mM	6,83	0,38 mM
F7	45 mM	5,05	15,26 mM
F8	45 mM	5,03	15,72 mM
F9	95 mM g/L	5,52	14,06 mM
F10	95 mM g/L	5,54	13,52 mM

Il est possible de voir que la concentration d'acide acétique non dissocié pour les fermentations autres que C1 est plus élevée, ce qui pourrait expliquer pourquoi le butanol a été produit plus rapidement, puisque le niveau d'acides non dissociés nécessaires pour passer vers la phase solvantogène a été atteint plus rapidement. Dans le cas des fermentations F9 et F10, qui ont produit plus d'isopropanol, la bactérie a possiblement utilisé l'acétate du tampon pour le produire, en affectant, en même temps, sa fonction, vu qu'il a été impossible de maintenir le pH autour de 5,5.

En ce qui concerne les fermentations avec du CaCO_3 , il est connu que l'ajout de celui-ci au milieu de culture est bénéfique pour la production de butanol. Le CaCO_3 améliore la fermentation de butanol en raison, à la fois, de son effet tampon et de sa capacité à influencer les processus cellulaires clés, tels que le transport des sucres, la tolérance au butanol et la solvantogénèse (Han et al., 2013). Dans le cas de la fermentation IBE, le CaCO_3 contribue également à augmenter la production du cofacteur NADPH, qui est réellement nécessaire en raison de la présence de l'enzyme alcool déshydrogénase secondaire (s-ADH) qui transforme l'acétone en isopropanol (Wang et al., 2018). Les expériences réalisées dans ce travail seraient l'une des rares rapportées dans la littérature qui rapporte l'impact du CaCO_3 sur la fermentation IBE.

La fonction tampon du CaCO_3 a pu être observée, vu que lors des fermentations avec CaCO_3 (F14, F15 et F16), la valeur du pH pendant la phase solvantogène était plus élevée (5,47-6,12) même s'il y avait une concentration majeure d'acides, principalement l'acide butyrique. Par contre, le pH du contrôle (C3) a varié entre 5,14-5,34. Ce comportement du pH a été déjà signalé dans certaines publications avec des fermentations ABE où le pH des cultures traitées au CaCO_3 était supérieur à 5,6 pendant toute la durée de la fermentation, alors que le pH du contrôle a varié de 5,2 à 5,5, après la diminution initiale du pH (Han et al., 2013).

L'ajout de CaCO_3 a aussi aidé l'augmentation de la consommation de glucose (66 %) en comparaison aux expériences avec une concentration de 60 g/L : F5 et F6 (54 % et 58 %) et le contrôle C3 (50 %). De plus, cette consommation a été atteinte dans un délai plus court, affectant positivement la productivité. Par exemple, à 48 heures, le moment où il y a eu l'augmentation la plus significative de la concentration en butanol, la productivité en butanol est passée de 0,08 g/L*h⁻¹ pour F5 et F6 ou 0,11 g/L*h⁻¹ pour C3 à 0,14 g/L*h⁻¹ pour F14, F15 et F16.

L'amélioration de la productivité grâce au CaCO_3 a été déjà rapportée dans les fermentations ABE. Le tableau 6.3 résume certains de ces travaux, avec les souches *C. beijerinckii*.

Tableau 6.3 Effet sur la productivité après l'ajout de CaCO_3 pour les fermentations ABE

Souche	Fermentation	Concentration	Productivité	Référence
		initiale de glucose (g/L)	ABE ((g/L* h^{-1})	
Clostridium beijerinckii NCIMB 8052	Contrôle	60	0,22	(Han et al., 2013)
	Avec CaCO_3	60	0,42	
<i>C. beijerinckii</i> 260	Contrôle	$59,07 \pm 1,8$	$0,29 \pm 0,003$	(Richmond et al., 2011)
	Avec CaCO_3	$58,63 \pm 0,6$	$0,47 \pm 0,01$	

Même s'il a été possible de voir l'effet du CaCO_3 sur la fermentation IBE, il serait intéressant de varier sa concentration afin de vérifier si c'est possible encore d'augmenter la consommation de glucose.

Pour les fermentations avec un contrôle de pH, la consommation de glucose a été supérieure à celle du contrôle : 77 % et 80 % pour F17 et F18, en comparaison à 41% pour C4. Malgré cela, cette augmentation n'a pas amélioré le rendement en butanol.

Cette série de fermentations a permis un suivi du pH plus précis pour identifier la valeur du pH minimal (5,12 pour F17 et 5,09 pour F18) et le moment de transition de la phase acidogène vers la phase solvantogène (13,5 h), en tenant compte du fait que le pH initial de la fermentation était d'environ 6,8, puisque cette valeur peut retarder ou accélérer ce moment de transition. Le contrôle du pH a également permis l'accumulation d'acides acétique et butyrique, un phénomène connu sous le nom de fermentation acidogène (Maddox et al., 2000). Cette accumulation des acides laisse penser que le contrôle du pH doit se faire par intervalles, car en accumulant les acides et en maintenant le même pH, implique qu'en même temps, les acides non dissociés s'accumulent également, ceux-ci étant nocifs pour la bactérie. Pour cette raison, une possibilité serait de maintenir le pH à une valeur qui permettrait une accumulation d'acides non dissociés jusqu'à la concentration minimale pour passer vers la phase solvantogène et dès que la concentration d'acides non dissociés diminue encore une fois à des valeurs défavorables, le contrôle du pH est activé à nouveau. Un contrôle actif du pH pourrait contribuer à limiter la concentration des acides non dissociés comme stratégie pour améliorer la production de butanol.

Une approche similaire a été utilisée avec la souche *C. acetobutylicum* DSM 792 (Capilla et al., 2021). La stratégie comprenait une acidification naturelle du milieu pendant l'étape d'acidogénèse jusqu'à un pH minimum, suivie d'une augmentation soudaine du pH jusqu'au 5,1. Cela a permis une production de butanol de 15,8 g/L malgré qu'une inhibition puisse se produire à une concentration de 13 g/L (Jones et al., 1986), indiquant qu'un retard de la mort cellulaire peut permettre de dépasser cette limite.

6.3 Ajout de butyrate

Contrairement aux fermentations ABE, l'ajout de butyrate n'a amélioré ni la consommation de glucose ni le rendement en butanol, un résultat similaire au seul travail rapporté dans la littérature concernant l'acide butyrique comme précurseur de la fermentation IBE avec la bactérie *C. beijerinckii* DSM 6423. Avila et al (2018) ont utilisé un mélange de sucres (fructose, glucose et saccharose) avec différentes concentrations initiales d'acide butyrique (0,5 g/L, 1,5 g/L, 2,2 g/L, 4,8 g/L et 6,5 g/L). Les données obtenues à des concentrations proches de celles utilisées dans ce travail (60 mM = 5,3 g/L), autrement dit à 4,8 g/L et 6,5 g/L, ont également montré que la consommation de sucres était inférieure par rapport aux expériences avec des concentrations plus faibles d'acide butyrique (0,5 g/L et 1,5 g/L).

Encore une fois, il est important de penser aux acides non dissociés. Probablement la combinaison de la concentration initiale d'acide butyrique (60 mM) et du pH initial (6,8) utilisé au cours de ce travail, n'a pas favorisé l'utilisation du butyrate comme un outil pour améliorer la consommation de glucose. Donc, différentes combinaisons d'acide butyrique et de pH initial pourraient être étudiées pour observer leur impact sur la production de butanol.

6.4 Fermentations avec un mélange de sucres

Les expériences réalisées avec le mélange synthétique de sucres ont montré la réalité à laquelle il faut se confronter pendant la fermentation ABE, qui peuvent se présenter aussi dans la fermentation IBE, en utilisant la biomasse lignocellulosique : la bactérie a une

préférence pour consommer d'abord le glucose, avec une utilisation lente ou incomplète d'autres sucres tels que le xylose.

Afin de survivre dans la nature, les micro-organismes doivent souvent consommer une variété de sucres disponibles comme sources de carbone et d'énergie. Étant donné que le glucose est le monomère glucidique le plus abondant, les voies métaboliques bactériennes pour la production d'énergie ont évolué de telle sorte que le métabolisme du glucose conduit à l'utilisation la plus efficace de l'énergie dans un micro-organisme. Bien que les espèces *Clostridium* productrices de butanol soient capables d'utiliser des sucres pentoses (xylose et arabinose) pour la production d'ABE, il y a une réduction d'efficacité de 50 % à 70 % lorsque la source de carbone préférée, le glucose, est présente dans le milieu de fermentation en présence d'autres sucres, en raison de processus de régulation tel que la répression catabolique (Ezeji et al., 2014).

Une situation similaire a été observée dans ce travail. En comparant la consommation de glucose entre les fermentations avec seulement 40 g/L de glucose (F3 et F4) et celles avec un mélange de sucres (F19, F20 et F21), la consommation est passée d'une moyenne de 95 % à 75 % avec une utilisation incomplète de groupe de sucres XMG.

En raison de la documentation limitée sur les fermentations IBE avec un mélange synthétique de sucres, les informations existantes sur le même sujet, mais dans les fermentations ABE, pourraient être prises en considération pour expliquer ce qui se passe dans les fermentations IBE. Par exemple, pour les fermentations ABE, il a été démontré que l'utilisation du xylose est étroitement liée à la proportion de xylose et de glucose dans le milieu de culture. Dans les fermentations avec divers mélanges de glucose / xylose et de cellules précultivées avec xylose, aucune absorption de xylose n'a été observée dans les mélanges dans lesquels la concentration de glucose dépassait celle du xylose. Cependant, un excès d'ajout de CaCO_3 a conduit à une bonne utilisation du xylose (El Kanouni et al., 1998).

Ceci suggère qu'il soit intéressant de réaliser une préculture en utilisant uniquement de la xylose et d'utiliser du CaCO_3 ou un contrôle de pH pour vérifier s'il est possible d'améliorer la consommation de xylose dans une fermentation IBE avec un mélange de

sucres. Cependant, plus de recherche sont nécessaires pour mieux comprendre l'utilisation d'un mélange de sucres par *C. beijerinckii* DSM 6413 et ainsi améliorer la production de butanol.

6.5 Fermentations avec hydrolysats de la tige de maïs

Le prétraitement de la biomasse affecte non seulement le rendement total en sucres, mais également le comportement et la croissance des micro-organismes pendant la fermentation en raison de la formation de composés comme le furfural, l'hydroxyméthylfurfural, les composés phénoliques solubles et quelques acides faibles comme l'acide acétique, l'acide formique et l'acide lévulinique. De plus, le niveau de toxicité dépend de nombreux facteurs tels que le type de micro-organisme, les conditions physiologiques de la souche, la concentration en oxygène dissous et le pH du milieu (Baral et al., 2014).

Jusqu'à présent, aucune étude n'a été menée sur les concentrations inhibitrices de ces composés sur la bactérie *C. beijerinckii* DSM 6423. Dans ce travail, en raison de l'absence dans l'hydrolysats d'acides faibles tels que l'acide formique ou l'acide lévulinique et en sachant que l'acide acétique peut favoriser la fermentation IBE (dos Santos Vieira et al., 2019), ce serait probablement des composés phénoliques qui auraient interféré avec un départ plus rapide de la fermentation.

Des travaux supplémentaires seraient nécessaires pour estimer ces concentrations inhibitrices. Dans le cas de la fermentation ABE, quelques chercheurs ont fait des efforts pour détecter cette concentration de composés phénoliques solubles. Le tableau 6.4 regroupe les concentrations inhibitrices pour certaines bactéries *C. beijerinckii* utilisées dans les fermentations ABE.

Tableau 6.4 Concentration inhibitrice des composés phénoliques solubles pour la souche *C. beijerinckii*

Souche	Concentration inhibitrice de	Référence
	composés phénoliques (g/L)	
<i>C. beijerinckii</i> IB4	1,2	(Baral et al., 2014)
<i>C. beijerinckii</i> RT66	1,9	

Malgré le fait que la fermentation a pris plus de temps à démarrer, la concentration en butanol et isopropanol ainsi que le rendement obtenu ont été comparés avec les résultats des fermentations ABE à partir de la tige de maïs, étant donné que ce travail serait la première tentative d'une fermentation IBE en utilisant la tige de maïs.

La concentration maximale ABE rapportée dans la littérature correspond à 26,27 g/L, avec un rendement de 0,44 g ABE/g de sucres consommés et une productivité de 0,31 g/L*h⁻¹ en utilisant la souche *C. beijerinckii* P260 (Qureshi et al., 2010). D'autres espèces de *Clostridium* capables de produire le butanol comme *C. acetobutylicum* P262, *C. beijerinckii* BA101, *C. acetobutylicum* 206 et *C. beijerinckii* NCIMB 8052, auraient produit des concentrations maximales d'ABE de 25,8, g/L 24,8 g/L, 24,7 g/L, 23,5 g/L et 19,2 g/L respectivement (Baral et al., 2016).

Bien que la concentration maximale d'IB obtenue dans ce travail n'ait été que de 12,16 g/l avec un rendement de 0,246 g d'IB/g de sucres consommés, cela ne signifie pas que l'utilisation du maïs doit être exclue comme substrat pour la fermentation IBE. Il est nécessaire de continuer les recherches pour comprendre le comportement de la bactérie *C. beijerinckii* DSM 6423 dans des milieux de cultures complexes et alternatifs.

Chapitre 7 - Conclusion

Dans chacune des séries de fermentations réalisées dans ce projet, il a été possible d'identifier des aspects clés qui ont permis une meilleure compréhension de la fermentation IBE. Un de ces aspects est l'impact du pH sur le développement de la fermentation.

L'utilisation du tampon acétate 50 mM ou de CaCO_3 , a permis de visualiser le besoin de contrôler le pH pendant les fermentations autour des valeurs de 5 et 5,5 pour faciliter l'assimilation du glucose. Ainsi, quand l'expérience avec le contrôle du pH a été réalisée, on a compris l'importance d'étudier plus en profondeur les acides non dissociés, vu qu'il est nécessaire d'identifier la quantité minimale nécessaire pour le passage de la phase acidogène vers la phase de la production de solvants et, en même temps, maintenir un niveau d'acidité qui ne soit pas nocif pour la bactérie, étant donné qu'il a été possible de consommer plus de glucose. Cependant, ce contrôle n'a pas été suffisant pour maintenir un niveau d'acides peu nocif pour que la bactérie puisse continuer à produire des solvants, parce que le rendement a diminué.

Bien que l'ajout du butyrate est reconnu comme une stratégie pour améliorer les fermentations de butanol, dans le cas des fermentations IBE, les résultats n'ont pas été à la hauteur des attentes. Cependant, comme le butanol a été obtenu plus rapidement, l'addition du butyrate a permis d'atteindre plus rapidement le niveau nécessaire pour changer vers la phase solvantogène.

L'expérience avec le mélange de sucres synthétiques a été un premier pas pour analyser l'impact d'un ensemble de sucres dans le métabolisme de la bactérie, une réalité qu'on doit confronter lorsqu'on travaille avec des substrats lignocellulosiques.

Finalement, pour les fermentations avec l'hydrolysats obtenu à partir de la tige de maïs prétraité, la production de butanol a été possible, mais une étape de détoxification est nécessaire pour enlever des inhibiteurs et améliorer la productivité. La présence d'acétate dans l'hydrolysats a permis aussi d'obtenir plus d'isopropanol.

Comme il a été indiqué, la fermentation IBE est en voie de développement et les recherches ne sont pas aussi extensives que c'est le cas pour la fermentation ABE. Ce

premier travail a permis d'étudier l'influence de plusieurs paramètres afin de définir les conditions d'une fermentation IBE réussie. Ces données seront fort utiles pour développer un procédé fermentaire IBE appliqué aux matières lignocellulosiques à travers les essais de fermenter un mélange de sucres simulant la composition du bois de bouleau jaune, ce qui représente une première, à notre connaissance.

Bibliographie

Adney, B., et J. Baker. (1996). Measurement of Cellulase Activities *Laboratory analytical procedure*, (1617): 1-8.

Agbor, V. B., N. Cicek, R. Sparling, A. Berlin, et D. B. Levin. (2011). Biomass pretreatment: fundamentals toward application, *Biotechnology advances*, (29): 675-85.

Andreesen, J. R., H. Bahl, et G. Gottschalk (1989) Introduction to the physiology and biochemistry of the genus *Clostridium*. in, *Clostridia* (Springer), pp. 27-62.

Aro, N., T. Pakula, et M. Penttilä. (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi, *FEMS microbiology reviews*, (29): 719-39.

Ávila, M., E. Rochón, M. D. Ferrani, et C. Lareo. 2018. "Evaluation of butyric acid addition on the isopropanol-butanol-ethanol (IBE) production from sugarcane and sweet sorghum juices by *Clostridium beijerinckii* DSM 6423." In *40th Symposium on Biomaterials, Fuels and Chemicals*,. United States.

Baral, N. R., J. Li, et A. K. Jha. (2014). Perspective and prospective of pretreatment of corn straw for butanol production, *Applied biochemistry and biotechnology*, (172): 840-53.

Baral, N. R., L. Slutzky, A. Shah, T. C. Ezeji, K. Cornish, et A. Christy. (2016). Acetone-butanol-ethanol fermentation of corn stover: current production methods, economic viability and commercial use, *FEMS microbiology letters*, (363).

Benali, M., O. Ajao, N. El Mehdi, A. M. Restrepo, N. Fradj, et Y. Boumghar. (2019). Acetone–Butanol–Ethanol Production from Eastern Canadian Yellow Birch and Screening of Isopropanol–Butanol–Ethanol-Producing Strains, *Industrial Biotechnology*, (15): 188-201.

Buendia-Kandia, F., E. Rondags, X. Framboisier, G. Mauviel, A. Dufour, et E. Guedon. (2018). Diauxic growth of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 when grown on mixtures of glucose and cellobiose, *AMB Express*, (8): 1-9.

Capilla, M., P. San-Valero, M. Izquierdo, J. Penya-roja, et C. Gabaldón. (2021). The combined effect on initial glucose concentration and pH control strategies for acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation by *Clostridium acetobutylicum* DSM 792, *Biochemical Engineering Journal*, (167): 107910.

Cebreiros, F., M. D. Ferrari, et C. Lareo. (2019). Cellulose hydrolysis and IBE fermentation of eucalyptus sawdust for enhanced biobutanol production by *Clostridium beijerinckii* DSM 6423, *Industrial Crops and Products*, (134): 50-61.

da Silva Trindade, W. R., et R. G. dos Santos. (2017). Review on the characteristics of butanol, its production and use as fuel in internal combustion engines, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, (69): 642-51.

Dalal, J., M. Das, S. Joy, M. Yama, et J. Rawat. (2019). Efficient isopropanol-butanol (IB) fermentation of rice straw hydrolysate by a newly isolated *Clostridium beijerinckii* strain C-01, *Biomass and Bioenergy*, (127): 105292.

De Gérando, H. M., F. Fayolle-Guichard, L. Rudant, S. Millah, F. Monot, N. L. Ferreira, et A. López-Contreras. (2016). Improving isopropanol tolerance and production of *Clostridium beijerinckii* DSM 6423 by random mutagenesis and genome shuffling, *Applied microbiology and biotechnology*, (100): 5427-36.

de Vrije, T., M. Budde, H. van der Wal, P. A. Claassen, et A. M. López-Contreras. (2013). "In situ" removal of isopropanol, butanol and ethanol from fermentation broth by gas stripping, *Bioresour Technol*, (137): 153-59.

Diallo, M., A. Simons, H. van der Wal, F. Collas, B. Houweling-Tan, S. Kengen, et A. López-Contreras. (2018). L-Rhamnose metabolism in *Clostridium beijerinckii* DSM 6423, *Appl. Environ. Microbiol.*: AEM. 02656-18.

dos Santos Vieira, C. F., F. Maugeri Filho, R. Maciel Filho, et A. P. Mariano. (2019). Acetone-free biobutanol production: past and recent advances in the Isopropanol-Butanol-Ethanol (IBE) fermentation, *Bioresour Technol*: 121425.

Duquette, S., M. Parenteau, M. Dubé, et S. Barnabé. 2013. "Corn crop residues." In *Proc. of 10th Research Forum on Recycling, TAPPI PEERS Conference - 10Th Research Forum on Recycling*, p.616-49. Green Bay, USA,.

Dürre, P. (1998). New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation, *Applied microbiology and biotechnology*, (49): 639-48.

El Kanouni, A., I. Zerdani, S. Zaafa, M. Znassni, M. Loutfi, et M. Boudouma. (1998). The improvement of glucose/xylose fermentation by *Clostridium acetobutylicum* using calcium carbonate, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, (14): 431-35.

Ezeji, T. C., et H. P. Blaschek. (2010). Butanol production from lignocellulosic biomass, *Biofuels from agricultural wastes and byproducts*: 19-37.

Ezeji, T. C., S. Liu, et N. Qureshi (2014) Mixed sugar fermentation by *Clostridia* and metabolic engineering for butanol production. in, *Biorefineries* (Elsevier), pp. 191-204.

García, V., J. Pääkilä, H. Ojamo, E. Muurinen, et R. L. Keiski. (2011). Challenges in biobutanol production: how to improve the efficiency?, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, (15): 964-80.

George, H., J. Johnson, W. Moore, L. Holdeman, et J. Chen. (1983). Acetone, isopropanol, and butanol production by *Clostridium beijerinckii* (syn. *Clostridium butylicum*) and *Clostridium aurantibutyricum*, *Appl. Environ. Microbiol.*, (45): 1160-63.

Han, B., V. Ujor, L. B. Lai, V. Gopalan, et T. C. Ezeji. (2013). Use of proteomic analysis to elucidate the role of calcium in acetone-butanol-ethanol fermentation by *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052, *Applied and environmental microbiology*, (79): 282-93.

Harmsen, P., W. Huijgen, L. Bermudez, et R. Bakker. 2010. "Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass." In.: Wageningen UR-Food & Biobased Research.

Ibrahim, M. F., N. Ramli, E. K. Bahrin, et S. Abd-Aziz. (2017). Cellulosic biobutanol by Clostridia: Challenges and improvements, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, (79): 1241-54.

Jiang, W., Z. Wen, M. Wu, H. Li, J. Yang, J. Lin, Y. Lin, L. Yang, et P. Cen. (2014). The effect of pH control on acetone-butanol-ethanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 with xylose and d-glucose and d-xylose mixture, *Chinese Journal of Chemical Engineering*, (22): 937-42.

Jones, D. T., et D. R. Woods. (1986). Acetone-butanol fermentation revisited, *Microbiological reviews*, (50): 484-524.

Jones, D. T., et D. R. Woods (1989) Solvent production. in, *Clostridia* (Springer), pp. 105-44.

Lee, S.-M., M. O. Cho, C. H. Park, Y.-C. Chung, J. H. Kim, B.-I. Sang, et Y. Um. (2008). Continuous butanol production using suspended and immobilized *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 with supplementary butyrate, *Energy & fuels*, (22): 3459-64.

Li, G., T. H. Lee, Z. Liu, C. F. Lee, et C. Zhang. (2019). Effects of injection strategies on combustion and emission characteristics of a common-rail diesel engine fueled with isopropanol-butanol-ethanol and diesel blends, *Renewable Energy*, (130): 677-86.

Liu, K., H. K. Atiyeh, O. Pardo-Planas, K. D. Ramachandriya, M. R. Wilkins, T. C. Ezeji, V. Ujor, et R. S. Tanner. (2015). Process development for biological production of butanol from Eastern redcedar, *Bioresour Technol*, (176): 88-97.

Maddox, I., E. Steiner, S. Hirsch, S. Wessner, N. Gutierrez, J. Gapes, et K. Schuster. (2000). The Cause of " Acid Crash" and " Acidogenic Fermentations" During the Batch Acetone-Butanol-Ethanol (ABE-) Fermentation Process, *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, (2): 95-100.

Mariano, A. P., T. C. Ezeji, et N. Qureshi (2015) Butanol production by fermentation: efficient bioreactors. in, *Commercializing Biobased Products*, pp. 48-70.

Mascal, M. (2012). Chemicals from biobutanol: technologies and markets, *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, (6): 483-93.

Mitchell, W. J. (1997) Physiology of carbohydrate to solvent conversion by clostridia. in, *Advances in microbial physiology* (Elsevier), pp. 31-130.

Morone, A., et R. Pandey. (2014). Lignocellulosic biobutanol production: Gridlocks and potential remedies, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, (37): 21-35.

Ndaba, B., I. Chiyanzu, et S. Marx. (2015). n-Butanol derived from biochemical and chemical routes: A review, *Biotechnology Reports*, (8): 1-9.

Prakash, A., R. Dhabhai, et V. Sharma. (2016). A review on fermentative production of biobutanol from biomass, *Current Biochemical Engineering*, (3): 37-46.

Procentese, A., F. Raganati, L. Navarini, G. Olivieri, M. Russo, et A. Marzocchella. (2018). Coffee silverskin as a renewable resource to produce butanol and isopropanol, *Chem Eng Trans*, (64).

Qureshi, N., B. C. Saha, R. E. Hector, B. Dien, S. Hughes, S. Liu, L. Iten, M. J. Bowman, G. Sarath, et M. A. Cotta. (2010). Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part II—Use of corn stover and switchgrass hydrolysates, *Biomass and Bioenergy*, (34): 566-71.

Richmond, C., B. Han, et T. Ezeji. (2011). Stimulatory effects of calcium carbonate on butanol production by solventogenic *Clostridium* species, *Continental Journal of Microbiology*, (5): 18-28.

Richter, H., N. Qureshi, S. Heger, B. Dien, M. A. Cotta, et L. T. Angenent. (2012). Prolonged conversion of n-butyrate to n-butanol with *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* in a two-stage continuous culture with in-situ product removal, *Biotechnology and bioengineering*, (109): 913-21.

Rochón, E., F. Cebreiros, M. D. Ferrari, et C. Lareo. 2015. "Isopropanol – Butanol – Ethanol (IBE) production from an industrial sugary material using *Clostridium beijerinckii* DSM 6423." In *XX Simpósio Nacional de Bioprocesso e XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassa*. Brasil.

Survase, S. A., G. Jurgens, A. Van Heiningen, et T. Granström. (2011). Continuous production of isopropanol and butanol using *Clostridium beijerinckii* DSM 6423, *Applied microbiology and biotechnology*, (91): 1305-13.

Survase, S. A., R. Zebroski, C. Bayuadri, Z. Wang, G. Adamos, G. Nagy, et V. Pylkkanen. (2019). Membrane assisted continuous production of solvents with integrated solvent removal using liquid-liquid extraction, *Bioresour Technol*, (280): 378-86.

Wang, C., F. Xin, X. Kong, J. Zhao, W. Dong, W. Zhang, J. Ma, H. Wu, et M. Jiang. (2018). Enhanced isopropanol–butanol–ethanol mixture production through manipulation

of intracellular NAD (P) H level in the recombinant *Clostridium acetobutylicum* XY16, *Biotechnology for biofuels*, (11): 12.

Xin, F., T. Chen, Y. Jiang, W. Dong, W. Zhang, M. Zhang, H. Wu, J. Ma, et M. Jiang. (2017). Strategies for improved isopropanol–butanol production by a *Clostridium* strain from glucose and hemicellulose through consolidated bioprocessing, *Biotechnology for biofuels*, (10): 118.

Xin, F., W. Dong, Y. Jiang, J. Ma, W. Zhang, H. Wu, M. Zhang, et M. Jiang. (2018). Recent advances on conversion and co-production of acetone-butanol-ethanol into high value-added bioproducts, *Critical reviews in biotechnology*, (38): 529-40.

Yang, Y., A. Hoogewind, Y. H. Moon, et D. Day. (2016). Production of butanol and isopropanol with an immobilized *Clostridium*, *Bioprocess and biosystems engineering*, (39): 421-28.

Youn, S. H., K. M. Lee, K.-Y. Kim, S.-M. Lee, H. M. Woo, et Y. Um. (2016). Effective isopropanol–butanol (IB) fermentation with high butanol content using a newly isolated *Clostridium* sp. A1424, *Biotechnology for biofuels*, (9): 230.

Zhang, C., T. Li, et J. He. (2018). Characterization and genome analysis of a butanol–isopropanol-producing *Clostridium beijerinckii* strain BGS1, *Biotechnology for biofuels*, (11): 280.

Zhang, S., C. Qu, X. Huang, Y. Suo, Z. Liao, et J. Wang. (2016). Enhanced isopropanol and n-butanol production by supplying exogenous acetic acid via co-culturing two *clostridium* strains from cassava bagasse hydrolysate, *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, (43): 915-25.

Annexe

A.1. Milieu de culture TYA

Tableau A.1. Composition du milieu TYA par litre

Réactif	Quantité (g)
Extrait de levure	2,0
Tryptone	6,0
Acétate d'ammonium	3,0
Sulfate de magnésium heptahydraté ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,3
Phosphate monopotassique (KH_2PO_4)	0,5
Sulfate ferreux heptahydraté ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,01
Sucres	Selon l'expérience

Préparation : Tous les réactifs, sauf les sucres, sont mélangés avec l'eau distillée et chauffés à ébullition pendant 1 minute. Après, le milieu est refroidi par barbotage avec l'azote haute pureté.

Si le milieu est partagé dans les bouteilles sérum, elles sont purgées avec l'azote haute pureté pour garantir l'absence d'oxygène.

Les solutions de sucres sont préparées séparément du milieu, selon les concentrations désirées et transférées dans les bouteilles sérum. Elles sont purgées avec la même méthode utilisée pour purger les bouteilles sérum avec le milieu TYA.

Finalement, le milieu et les solutions de sucres sont stérilisés à l'autoclave (Autester ST dry PV-II 140, Selecta) à 121 °C pendant 15 minutes.

A.2. Calcul des acides non dissociés

La concentration des acides organiques non dissociés dans le milieu, a été calculée à partir de la concentration de n-butyrate ou d'acétate total et de la valeur du pH, à l'aide de l'équation Hendersson–Hasselbalch :

$$pH - pK_A = \text{Log} \frac{[A^-]}{[AH]}$$

Où pH est la valeur du pH, pK_A a une valeur de 4,8 pour le n-butyrate ou 4,76 pour l'acétate, qui est le logarithme négatif de la constante de dissociation acide, $[A^-]$ est la concentration d'anions pour le n-butyrate ou l'acétate et $[AH]$ est la concentration des acides non dissociés pour chacun d'eux.